

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Pediatría



TESIS DOCTORAL

**Factores de riesgo asociados a las secuelas neurológicas y auditivas en
la cohorte nacional de niños con infección congénita por
citomegalovirus**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel Blázquez Gamero

Directores

**Jesús Ruiz Contreras
Pablo Rojo Conejo**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Pediatría



**FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LAS SECUELAS
NEUROLÓGICAS Y AUDITIVAS EN LA COHORTE NACIONAL DE
NIÑOS CON INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel Blázquez Gamero

Bajo la dirección de los doctores

Jesús Ruíz Contreras

Pablo Rojo Conejo

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Pediatría



**FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LAS SECUELAS
NEUROLÓGICAS Y AUDITIVAS EN LA COHORTE NACIONAL DE
NIÑOS CON INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS**

Tesis Doctoral

Daniel Blázquez Gamero

DIRECTORES DE TESIS

Jesús Ruíz Contreras

Pablo Rojo Conejo

Madrid, 2015



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Daniel Blázquez Gamero
Título de la Tesis	Factores de riesgo asociados a las secuelas neurológicas y auditivas en la cohorte nacional de niños con infección congénita por citomegalovirus
Facultad o Centro	Facultad de Medicina. Universidad Complutense

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	Jesús Ruiz Contreras
Centro al que pertenece y dirección	Facultad de Medicina de la UCM. Hospital Universitario 12 de Octubre. Cra. de Córdoba sn. 28041: Madrid
D.N.I./Pasaporte	06519033M
e-mail	jesus.ruiz@salud.madrids.org ; jesuruiz@ucm.es

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad		X		
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

Confirmando que Daniel Blázquez Gamero ha realizado, bajo mi dirección, el presente trabajo para optar al título de Doctor en Medicina.

El estudio ha sido realizado siguiendo todos los criterios de excelencia de un trabajo científico en los diferentes apartados: estado actual del tema, hipótesis, objetivos, material y métodos, resultados y conclusiones.

La hipótesis de la que parte el trabajo establece que es posible identificar los factores de riesgo de la aparición de hipoacusia y alteraciones del desarrollo neurológico en niños con infección congénita por citomegalovirus (CMV). De esta forma, los niños de riesgo podrían ser tratados con Valganciclovir para atenuar o disminuir la frecuencia o gravedad de estas complicaciones.

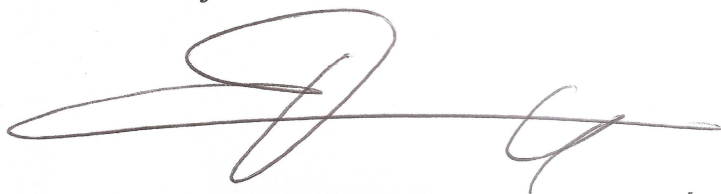
El estudio realiza análisis univariante y multivariante de las diferentes variables independientes asociadas a los eventos anteriores, y el efecto de la asociación se expresa en forma de Odds ratio con IC del 95%.

También se construye un modelo predictivo mediante regresión logística y análisis discriminante.

Los resultados del trabajo son relevantes y contribuirán a mejorar el pronóstico de la infección congénita por CMV.

Madrid, a 15 de Octubre de 2015

Fdo.: Prof. Jesús Ruiz Contreras

A handwritten signature in dark ink, consisting of a large, stylized 'J' followed by a horizontal line and a small flourish.

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.



Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Daniel Blázquez Gamero
Título de la Tesis	FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LAS SECUELAS NEUROLÓGICAS Y AUDITIVAS EN LA COHORTE NACIONAL DE NIÑOS CON INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS
Facultad o Centro	FACULTAD DE MEDICINA. DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	PABLO ROJO CONEJO.
Centro al que pertenece y dirección	HOSPITAL 12 OCTUBRE.
D.N.I./Pasaporte	02904487R
e-mail	pablo.rojo.conejo @ aim . com

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

INFORME (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

- Creo que se trata de un trabajo de un interés científico muy alto debido al humano mestral que presenta. Además tiene un alto rigor metodológico y muy bien presentados los resultados.

Madrid, a

26 de octubre de 2015

Fdo.:

Pablo Rojo Conejo

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.

A Celia y Bego

*"No te rindas, por favor no cedas,
Aunque el frío queme,
Aunque el miedo muerda,
Aunque el sol se esconda,
Y se calle el viento,
Aún hay fuego en tu alma
Aún hay vida en tus sueños".*

Mario Benedetti

"Pon un gramo de audacia en todo lo que hagas"

Baltasar Gracián

*"Yo estoy absolutamente convencido de que no viviré tanto como para acabar
olvidándote"*

Bryce Echenique. El hombre que hablaba de Octavia de Cádiz

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias a todos los investigadores (Anexo III) que participan en la red REDICCMV por su esfuerzo desinteresado, destinado a mejorar la atención a los niños con citomegalovirus congénito. A Fernando, a Ton, a la SEIP y a la SEN, por su apoyo decidido a este proyecto. A las familias y a nuestros pequeños pacientes, por su lucha diaria y por enseñarme más que muchos libros. A mis directores de tesis. A Pablo Rojo por su inagotable energía motivadora y su vocación investigadora. Sin su ayuda y empuje, este proyecto no habría nacido. A Jesús Ruíz Contreras, a quién considero mi maestro, por su calidad humana y científica y por todo el apoyo a lo largo de los años. Sin duda alguna, la persona que más medicina me ha enseñado. A Maribel, por tantas oportunidades y por su cariño, a Maite, por su paciencia y a mis compañeros de infecciosas de lactantes, de neonatos y de obstetricia, por su ayuda. A mis virólogas de cabecera: Dolores Folgueira y Patricia Brañas. A Gisela, María, Beatriz, Virginia, Teresa y Raquel por su colaboración y trabajo en los estudios, a Fide y Antonio por el apoyo informático, a David por su orientación estadística, a Ana Alarcón por sus consejos, a Martin por su revisión del inglés y a John Coltrane, por su inestimable ayuda para acabar esta tesis.

A mis padres, Pepa y Julián y a mi hermana María, porque siempre están ahí, por su calor y porque les debo todo. A Bego y Celia, por su amor infinito en este viaje.

ABREVIATURAS

μL: microlitro

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

AUC: área bajo la curva

CMV: citomegalovirus

CMVc: citomegalovirus congénito

cs: células

CV: carga viral

dB: decibelios

GPT: transaminasa glutámico-pirúvica

Hb: hemoglobina

HHV-6: virus herpes humano tipo 6

HHV-7: virus herpes humano tipo 7

HIG: inmunoglobulina hiperinmune

Hz: hercios

IC 95%: intervalo de confianza al 95%

IFN γ : interferón γ

IgG: inmunoglobulina G

IgM: inmunoglobulina M

IL: interleuquina

KIR: killer immunoglobulin-like receptors

LCR: líquido cefalorraquídeo

Ln: logaritmo neperiano

MCP: major capsid protein

mCP: minor capsid protein

mm³: milímetro cúbico

MMP-9: metaloproteínasa 9

NK: natural killers

OR: Odds Ratio

ORF: open reading frames

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEATC: Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Cerebral

PL: punción lumbar

REDCap: Research Electronic Data Capture

REDICCMV: Registro Estatal de Infección Congénita por Citomegalovirus

RIQ: rango intercuartílico

RMN: resonancia magnética nuclear

ROC: receiver operating characteristic

SD: desviación estándar

SEIP: Sociedad Española de Infectología Pediátrica

SEN: Sociedad Española de Neonatología

SNC: sistema nervioso central

T: trimestre

TAC: tomografía axial computerizada

TARGA: Tratamiento Antiretroviral de Gran Actividad

TCR: receptor de linfocitos T

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TLR: toll like receptors

UI: unidades internacionales

UL: unique long region

US: unique short region

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VLE: vasculopatía lenticuloestriada

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

1	RESUMEN	3
2	INTRODUCCIÓN	15
2.1	El virus	15
2.2	Epidemiología	18
2.3	Inmunología	20
2.4	Patogenia	24
2.5	Diagnóstico en la gestación	33
2.6	Clínica	38
2.7	Diagnóstico en el recién nacido	42
2.8	Factores pronósticos de secuelas	47
3	JUSTIFICACIÓN	61
4	HIPÓTESIS	65
5	OBJETIVOS	69
5.1	Principales	69
5.2	Secundarios	69
6	MATERIAL Y MÉTODOS	73
6.1	Diseño del estudio	73

6.2	Población y ámbito del estudio.....	73
6.3	Base de datos	76
6.4	Periodo del estudio.....	77
6.5	Definiciones	77
6.6	Variables	80
6.7	Recogida de los datos.....	91
6.8	Consideraciones éticas.....	92
6.9	Estadística.....	93
7	RESULTADOS	105
7.1	Análisis descriptivo de la población de estudio	105
7.2	Relación entre las variables gestacionales y las secuelas.....	130
7.3	Relación entre las variables neonatales y las secuelas.....	141
7.4	Modelos predictivos de secuelas	150
7.5	PCR en el LCR y riesgo de secuelas.....	159
7.6	Vasculopatía lenticuloestriada y riesgo de secuelas.....	162
8	DISCUSIÓN	167
8.1	Factores de riesgo prenatales.....	167
8.2	Factores de riesgo neonatales para el desarrollo de hipoacusia.....	172
8.3	Factores de riesgo neonatales y secuelas neurológicas	177

8.4	Modelo pronóstico de hipoacusia	183
8.5	Modelo pronóstico de alteraciones neurológicas	184
8.6	Resultado de la PCR en el LCR y secuelas	185
8.7	Vasculopatía lenticuloestriada y secuelas.....	188
8.8	Características maternas y gestacionales	192
8.9	Características del niño	194
8.10	Tratamiento antiviral	196
8.11	Seguimiento	199
8.12	Limitaciones del estudio	201
9	CONCLUSIONES	207
10	BIBLIOGRAFÍA	211
11	ANEXOS	239
11.1	Anexo I. Consentimiento informado	
11.2	Anexo II. Artículos publicados	
11.3	Anexo III. Investigadores de REDICCMV	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los herpesvirus humanos	17
Tabla 2. Hallazgos más frecuentes en las ecografías fetales	36
Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de las diferentes técnicas de diagnóstico de la infección congénita por CMV	47
Tabla 4. Hallazgos estudiados en la ecografía fetal.	82
Tabla 5. Hallazgos en la ecografía transfontanelar neonatal y en la resonancia magnética nuclear craneal que se consideraron compatibles con una infección congénita por CMV	86
Tabla 6. Clasificación de la gravedad de la hipoacusia	88
Tabla 7. Efectos adversos del tratamiento antiviral	90
Tabla 8. Variables que se incluyeron en el análisis univariado de los factores pronósticos de secuelas neurosensoriales	96
Tabla 9. Variables estudiadas para elaborar un modelo predictivo de hipoacusia y alteraciones neurológicas	98
Tabla 10. Pacientes incluidos en el registro por centro.....	106
Tabla 11. Nacionalidades de las madres.....	107
Tabla 12. Características clínicas de las madres	109
Tabla 13. Características del recién nacido.....	112
Tabla 14. Características clínicas y analíticas del recién nacido	113
Tabla 15. Estudios microbiológicos en el recién nacido.	115
Tabla 16. Hallazgos característicos en la ecografía neoantal.....	117

Tabla 17. Hallazgos característicos en la resonancia magnética craneal.....	118
Tabla 18. Tratamiento antiviral	122
Tabla 19. Análisis univariado del tratamiento antiviral.....	126
Tabla 20. Curva ROC del modelo de tratamiento antiviral.	127
Tabla 21. Variables antropométricas a los 6 y 12 meses	128
Tabla 22. Evaluación auditiva al nacimiento y a los 6 y 12 meses de edad.....	129
Tabla 23. Presencia de alteraciones neurológicas a los 6 y 12 meses de edad..	129
Tabla 24. Hallazgos ecográficos fetales.....	131
Tabla 25. Hallazgos en la resonancia magnética fetal.....	132
Tabla 26. Área bajo la curva (AUC) de la ecografía fetal del segundo y tercer trimestre y de la resonancia magnética fetal	133
Tabla 27. Análisis univariado de las variables gestacionales y la hipoacusia..	136
Tabla 28. Análisis univariado de las variables gestacionales y las alteraciones neurológicas.....	136
Tabla 29. Modelo de regresión logística de la ecografía fetal y la edad gestacional en el momento de la infección materna y su asociación con la hipoacusia.....	140
Tabla 30. Modelo de regresión logística de la ecografía fetal y la edad gestacional en el momento de la infección materna y su asociación con las alteraciones neurológicas	140
Tabla 31. Análisis univariado de las variables neonatales y la hipoacusia	145

Tabla 32. Número y porcentaje de niños que desarrollan hipoacusia sobre el total de niños con un factor de riesgo determinado.	146
Tabla 33. Modelo de regresión logística multivariante para las variables relacionadas con la presencia de hipoacusia	147
Tabla 34. Análisis univariado de las variables neonatales con las alteraciones neurológicas.....	148
Tabla 35. Número y porcentaje de niños con alteraciones neurológicas sobre el total de niños con un factor de riesgo determinado.	149
Tabla 36. Modelo de regresión logística multivariante para las variables relacionadas con el desarrollo de alteraciones neurológicas.....	150
Tabla 37. Variables que se asocian a secuelas en el modelo pronóstico. Análisis univariado.	151
Tabla 38. Coeficientes β del modelo pronóstico de hipoacusia.....	153
Tabla 39. Área bajo la curva ROC del modelo pronóstico de hipoacusia.....	154
Tabla 40. Fórmula de regresión del modelo de predictivo de hipoacusia.....	154
Tabla 41. Probabilidad de presencia de hipoacusia	155
Tabla 42. Coeficientes β del modelo pronóstico de alteraciones neurológicas	156
Tabla 43. Área bajo la curva ROC del modelo pronóstico de alteraciones neurológicas.....	157
Tabla 44. Fórmula de regresión del modelo predictivo de alteraciones neruológicas.....	158
Tabla 45. Probabilidad de presencia alteraciones neurológicas	158

Tabla 46. Riesgo de desarrollo de hipoacusia y alteraciones neurológicas y PCR en líquido cefalorraquídeo	160
Tabla 47. Riesgo de desarrollo de hipoacusia y alteraciones neurológicas y vasculopatía lenticuloestriada (VLE) según otras alteraciones en la ecografía	163
Tabla 48. Riesgo de desarrollo de hipoacusia y alteraciones neurológicas y vasculopatía lenticuloestriada (VLE) según el tratamiento antiviral	164

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos patogénicos de la infección del SNC fetal	29
Figura 2. Células en “Ojo de Búho” características de la infección por CMV	32
Figura 3. Avidéz de las inmunoglobulinas.....	35
Figura 4. Riesgo de secuelas neurológicas e hipoacusia en función de los síntomas al nacer	53
Figura 6. Página web de REDICCMV.....	75
Figura 5. Mapa de centros participantes en la red REDICCMV	74
Figura 7. Captura de pantalla de la base de datos online.....	77
Figura 8. Carga viral en sangre en función de la edad del niño	116
Figura 9. Resultado de la resonancia magnética nuclear neonatal y la ecografía neonatal.....	120
Figura 10. Tiempo de tratamiento antiviral total y presencia de neutropenia.	123
Figura 11. Tiempo de tratamiento antiviral total e hipoacusia a los 12 meses	124
Figura 12. Tiempo de tratamiento antiviral total y alteraciones neurológicas.	124
Figura 13. Presencia de alteraciones en la resonancia magnética nuclear neonatal en niños con ecografías fetales normales	134
Figura 14. Presencia de alteraciones en la resonancia magnética nuclear neonatal en niños con resonancias fetales normales.	135
Figura 15. Edad gestacional en semanas en la infección materna e hipoacusia a los 6 meses	137

Figura 16. Edad gestacional en semanas en la infección materna e hipoacusia a los 12 meses.	138
Figura 17. Edad gestacional en semanas en la infección materna y alteraciones neurológicas a los 6 meses.....	138
Figura 18. Edad gestacional en semanas en la infección materna y alteraciones neurológicas a los 12 meses.....	139
Figura 19. Comparación de la carga viral de CMV en sangre entre los niños con y sin hipoacusia a los 6 meses.....	142
Figura 20. Comparación de la carga viral de CMV en sangre entre los niños con y sin hipoacusia a los 12 meses.....	142
Figura 21. Comparación de la carga viral de CMV en sangre entre los niños con y sin alteraciones neurológicas a los 6 meses.	143
Figura 22. Comparación de la carga viral de CMV en sangre entre los niños con y sin alteraciones neurológicas a los 12 meses	143
Figura 23. Área bajo la curva ROC de la carga viral al nacimiento en relación con la presencia de hipoacusia a los 12 meses de edad.	144
Figura 24. Área bajo la curva ROC para la presencia de hipoacusia los 12 meses en función del modelo pronóstico evaluado.....	153
Figura 25. Área bajo la curva ROC para la presencia de alteraciones neurológicas a los 12 meses en función del modelo pronóstico evaluado	157
Figura 26. Carga viral de CMV en sangre en función del resultado de la PCR CMV del líquido cefalorraquídeo	161

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Resonancia magnética fetal.....	37
Imagen 2. Resonancia magnética neonatal	43

1. RESUMEN

1 RESUMEN

Título:

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LAS SECUELAS NEUROLÓGICAS Y AUDITIVAS EN LA COHORTE NACIONAL DE NIÑOS CON INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS.

Introducción:

El citomegalovirus humano (CMV) es la primera causa de infección congénita a nivel mundial. En la unión europea nacen anualmente 40000 niños con esta infección y hasta un 15-20% van a desarrollar secuelas a largo plazo, principalmente hipoacusia y alteraciones neurológicas. Los factores de riesgo asociados a las secuelas a largo plazo no han sido determinados con exactitud y es difícil predecir qué niños van a desarrollar secuelas.

Objetivos:

Estudiar los factores de riesgo que se asocian al desarrollo de hipoacusia y de alteraciones neurológicas en la cohorte estatal de niños con infección congénita por CMV y desarrollar un modelo predictivo de secuelas.

Material y métodos:

Estudio longitudinal prospectivo multicéntrico que se desarrolla en una cohorte nacional de niños con infección congénita por citomegalovirus. Se incluyeron

aquellos niños con un aislamiento para CMV positivo (cultivo viral o PCR) en fluidos corporales durante los primeros 14 días de vida y nacidos entre 2011 y 2015. Participaron 34 hospitales de toda España. Se realizó un seguimiento longitudinal de estos pacientes, con una evaluación auditiva (PEATC) y neurológica a los 6 y 12 meses de edad. Se definió hipoacusia como la presencia en al menos un oído de un umbral de respuesta ≥ 25 dB en los PEATC. Se definió la alteración neurológica a los 6 y 12 meses como la presencia de alteraciones motoras (espasticidad o paresias), epilepsia, coriorretinitis, retraso madurativo para su edad objetivado por un neurólogo infantil y la incapacidad para mantener la sedestación sin ayuda a los 12 meses.

Se construyeron modelos de regresión logística multivariantes para describir la asociación de los factores de riesgo con el desarrollo de hipoacusia y/o alteraciones neurológicas. Se realizaron dos modelos pronósticos de hipoacusia y de alteraciones neurológicas a los 12 meses de edad.

Resultados:

Se incluyó a 297 niños con CMVc. El 82,8% de las madres eran de origen español. En 132 gestaciones se dispuso de serología y se demostró una primoinfección en el 72% de los casos. Se realizaron 49 amniocentesis y la PCR de CMV fue negativa en el 34,7% de los líquidos amnióticos. Realizar la amniocentesis antes de la semana 20 se asoció con un mayor riesgo de obtener un resultado falso negativo ($p=0,012$; $OR=1,3$ (IC95%: 1,01-1,77)). Hasta un

63,2% de los niños con una ecografía fetal normal en el segundo trimestre y un 48,7% al tercero, presentaron alteraciones en la RMN al nacer. En el 10,1% de los casos el diagnóstico de la infección fue intraútero, en el 72,6% fue al nacer y en un 17,3% fue un diagnóstico retrospectivo mediante la PCR en sangre seca de las pruebas metabólicas. El 47,9% presentó una infección sintomática al nacer y el 30,6% tenían alguna alteración analítica. Un 35% de niños con una ecografía normal presentaron alteraciones en la RMN. En cuanto al tratamiento antiviral un 5,6% recibió ganciclovir, un 28% valganciclovir, un 37,7% una combinación de ambos y un 28,7% no recibió tratamiento. Un 36,5% de los casos presentaron hipoacusia en algún oído al nacer y en un 9,8% se produjo un empeoramiento de la hipoacusia a los 12 meses de edad. A los 12 meses de edad, un 29,8% presentaron alteraciones neurológicas. Entre las variables gestacionales estudiadas, la presencia de alteraciones en la ecografía fetal fue un factor de riesgo independiente asociado a la hipoacusia y a las alteraciones neurológicas a largo plazo (OR: 9,9 (IC95%:1,5-65,9); $p=0,017$ y OR=61,5 (IC95%:4,7-802,4) $p=0,002$ respectivamente). La esplenomegalia y la hipoacusia al nacimiento son factores de riesgo independientes asociados a la presencia de hipoacusia a los 6 meses de edad (OR:13,7 (IC95%:1,5-128,6); $p=0,022$ y OR:51,3 (IC95%:15,2-173,5); $p=0,0001$ respectivamente). La elevación de la GPT > 80 UI/L al nacimiento y la hipoacusia al nacimiento son factores de riesgo independientes de desarrollo de secuelas neurológicas a los 12 meses (OR: 7,5 (IC95%:1,0-57,2); $p=0,05$ y OR: 6,9 (IC95%:2,1-22,2); $p=0,001$ respectivamente). El modelo pronóstico del riesgo de

hipoacusia a los 12 meses incluyó el valor de la GPT (UI/L), la esplenomegalia y la hipoacusia al nacer, y presenta una AUC de 0,9 (IC95%: 0,8-0,9). El modelo pronóstico del riesgo alteraciones neurológicas a los 12 meses incluyó el valor de la GPT (UI/L), las alteraciones en la ecografía neonatal y la presencia de hipoacusia al nacer, y presentó una AUC de 0,88 (IC95%: 0,8-0,96). Una PCR positiva en LCR se asoció a un mayor riesgo de hipoacusia a los 6 meses en los niños con alteraciones en la ecografía (OR= 13,9 (1,5-125,6); $p=0,009$), pero no se han encontrado diferencias significativas entre los niños sin alteraciones en la ecografía. Entre los niños sin otras alteraciones ecográficas, la presencia de vasculopatía lenticuloestriada (VLE) no se asocia a un mayor riesgo de hipoacusia ni de alteraciones neurológicas a largo plazo. La presencia de VLE en niños con otras alteraciones ecográficas se asoció a un mayor riesgo de hipoacusia (OR= 8 (1,5-41,5); $p=0,001$).

Conclusiones:

La presencia de una ecografía fetal alterada es un factor de riesgo independiente asociado al desarrollo de secuelas. La hipoacusia y la esplenomegalia al nacimiento son factores de riesgo independientes asociados a la presencia de hipoacusia a largo plazo. La hipoacusia al nacer y la elevación de la GPT son factores de riesgo independientes asociados a las secuelas neurológicas. El modelo pronóstico de hipoacusia a los 12 meses incluye el valor de la GPT y la presencia de esplenomegalia e hipoacusia al nacer y tiene

una elevada capacidad predictiva (AUC: 0,902; IC95%: 0,83-0,97). El modelo pronóstico de alteraciones neurológicas a los 12 meses incluye el valor de la GPT y la presencia de alteraciones ecográficas e hipoacusia al nacer y también presenta una elevada capacidad predictiva (AUC: 0,88; IC95%:0,8-0,96). No se ha podido demostrar que la presencia de una PCR positiva en LCR o la vasculopatía lenticuloestriada aislada en niños asintomáticos se asocien a un mayor riesgo de secuelas.

ABSTRACT

Title:

RISK FACTORS ASSOCIATED WITH NEUROLOGICAL SEQUELAE AND HEARING LOSS IN THE NATIONAL COHORT OF CHILDREN WITH CONGENITAL CITOMEGALOVIRUS INFECTION.

Introduction:

Human cytomegalovirus (HCMV) is a leading cause of congenital infection worldwide. In the European Union 40,000 children are born annually with this infection and up to 15-20% will develop long-term sequelae (hearing loss and neurological abnormalities). Risk factors associated with long-term sequelae have not been determined accurately and it is difficult to predict which children will develop these sequelae.

Aims:

To study risk factors associated with long term sequelae (hearing loss and neurologic abnormalities) in a national cohort of children with congenital cytomegalovirus (cCMV) and develop a sequelae prognostic model.

Methods:

A national multicentre cCMV prospective study was conducted, and those children with an isolation of HCMV (viral culture or PCR) in body fluids within two weeks of life and born between 2011 and 2015 were included. Thirty-four

hospitals in Spain took part in the study. Children were followed up during the first year of life and an Auditory Brainstem Response (ABR) and a neurologic evaluation were performed at 6 and 12 months of age. Hearing loss was defined as a hearing threshold in at least one ear ≥ 25 dB. Neurologic impairment was defined as the presence of motor disorders (spasticity or paresis), epilepsy, chorioretinitis, developmental delay evaluated by a pediatric neurologist and failure to maintain the sitting position without support at 12 months of age. To study associations of risk factors and hearing loss and neurologic impairment multivariate logistic regression models were constructed. Two prognostic models for hearing loss and neurologic impairment at 12 months were developed.

Results:

We included 297 children with cCMV. Eighty-two percent of the mothers were Spanish. Serologic studies were available in 132 pregnancies and primary infection was confirmed in 72% of the cases. Amniocentesis was performed in 49 pregnancies and CMV PCR was negative in 34.7%. Amniocentesis before 20 weeks of gestation was associated with a higher risk of false negative result ($p = 0.012$; OR = 1.3 (CI95%: 1.01 to 1.77)). Up to 63.2% of children with a normal fetal ultrasound (US) in the second trimester, and 48.7% with normal US in the third, presented abnormalities on cranial MRI at birth. Diagnosis of cCMV was performed during pregnancy in 10.1%, at birth in 72.6% and retrospective

diagnosis using dried blood spots was performed in 17.3% of the cases. Forty-seven percent presented a symptomatic infection at birth and 30.6% presented laboratory abnormalities. Thirty-five percent of children with normal US at birth showed abnormalities in MRI. Regarding antiviral therapy, 5.6% received ganciclovir, 28% valganciclovir, 37.7% a combination of both and 28.7% received no treatment. Thirty-six percent presented hearing loss at birth and 9.8% showed a worsening of hearing. At 12 months 29.8% had neurologic impairment. Abnormal fetal ultrasound was an independent risk factor associated with hearing loss and long-term neurological disorders (OR: 9.9 (CI95% 1.5 to 65.9); $p = 0.017$ and OR = 61.5 (95% CI95% 4.7 to 802.4) $p = 0.002$ respectively). Splenomegaly and hearing loss at birth were independent risk factors associated with the presence of hearing loss at 6 months of age (OR: 13.7 (CI95%: 1.5 to 128.6); $p = 0.022$ and OR: 51, 3 (CI95%: 15.2 to 173.5), $p = 0.0001$, respectively). GPT elevation > 80 IU/L and hearing loss at birth were independent risk factors of neurologic impairment at 12 months (OR: 7.5 (CI95%: 1.0 to 57.2); $p = 0.05$ and OR = 6.9 (CI95% 2.1 to 22.2); $p = 0.001$ respectively). The prognostic model for hearing loss included the value of GPT at birth (IU/L), splenomegaly and hearing loss at birth, and had an AUC of 0.9 (CI95%: 0.8-0.9). The prognostic model of neurologic impairment included the value of GPT (IU/L), abnormalities in US at birth and hearing loss at birth, and showed an AUC of 0.88 (CI95%: 0.8 -0.96). A positive PCR result in cerebrospinal fluid (CSF) in children with abnormalities on ultrasound was

associated with an increased risk of hearing loss at 6 months (OR = 13.9 (CI95%1.5-125.6); $p = 0.009$), but there was no association in children with normal ultrasound. Among children without other ultrasound abnormalities, lenticuloestriated vasculopathy (LSV) was not a high-risk marker of hearing loss or neurologic impairment. LSV in children with ultrasound abnormalities was associated with an increased risk of hearing loss (OR = 8 (1.5 to 41.5); $p = 0.001$).

Conclusions:

Abnormal fetal ultrasound was an independent risk factor associated with long-term sequelae. Hearing loss at birth and splenomegaly were independent risk factors associated with long-term hearing loss. Hearing loss at birth and increased GPT levels were independent risk factors associated with neurologic impairment. The prognostic model for hearing loss included the value of GPT, splenomegaly and hearing loss at birth, and presented a high predictive power (AUC of 0.9 (CI95%: 0.8-0.9)) The prognostic model for neurologic impairment included the value of GPT, abnormalities in US at birth and hearing loss at birth, and showed a high predictive power (AUC of 0.88 (CI95%: 0.8 -0.96)). Neither positive PCR in CSF nor VLE were associated in asymptomatic children with an increased risk of long-term sequelae.

2. INTRODUCCIÓN

2 INTRODUCCIÓN

El citomegalovirus (CMV) humano es la primera causa de infección congénita a nivel mundial¹. Se produce por la transmisión transplacentaria del virus durante la gestación, tras una primoinfección materna, una reinfección por una cepa distinta o por una reactivación de un virus latente. El primer aislamiento del CMV a partir de un paciente vivo se logró en 1955. El paciente era un niño de 3 meses de edad, con microcefalia, ictericia y hepatoesplenomegalia, en el que inicialmente se sospechó una toxoplasmosis congénita. Se realizó una biopsia hepática en la que un equipo de la Universidad de Harvard, liderado por Thomas H. Weller, encontró las características inclusiones intranucleares del CMV y finalmente se pudo confirmar que el CMV era el responsable de los síntomas que presentaba².

2.1 El virus

El CMV es un β -herpesvirus humano, que se encuentra ampliamente distribuido y que comparte subfamilia con otros virus herpes, como el Virus Herpes Humano tipo 6 (HHV-6) o el Virus Herpes Humano tipo 7 (HHV-7) y con otros citomegalovirus específicos de mamíferos³ (Tabla 1). Es el β -herpesvirus de mayor tamaño, alcanzando un diámetro de 200-300 nm. Presenta un genoma de ADN lineal bicatenario de 235 Kbp, dentro de una cápside icosaédrica de 162 capsómeros. Los distintos genes virales y ORFs (*Open Reading Frames*) se designan en función de su localización en la zona UL

("Unique long region"), la zona US ("Unique short region") o las zonas internas o terminales^{4,5}. Los genes se denominan por el elemento que codifican: *p* para proteínas, *gp* para glicoproteínas y *pp* para fosfoproteínas, seguido de la región (UL o US) y la posición que ocupan. Por ejemplo, *gpUL75 (gH)*, es el gen que codifica la glicoproteína H y que se encuentra localizado en la *Unique long region*, en posición 75⁵. El genoma del CMV codifica 189 proteínas diferentes. Cuatro proteínas virales constituyen parte la cápside: pUL46, pUL48,5, mCP (pUL85, *minor capsid protein*) y MCP (pUL86, *major capsid protein*). La cápside está incluida dentro del tegumento que es una matriz proteica rodeada de una bicapa lipídica^{4,5}. El tegumento contiene la mayoría de las proteínas virales, incluida la proteína pp65, que es la que se detecta al realizar la prueba de la antigenemia. Las diferentes proteínas del tegumento tienen una función principalmente estructural, pero también participan en la regulación de la respuesta inmune del huésped a la infección, facilitando la replicación viral. En la envoltura lipídica se encuentran más de 20 glicoproteínas virales diferentes, entre las que se figuran gM (gpUL100), gN (gpUL73), gB (gpUL55), gH (gpUL75), gL (gpUL115), gO (gpUL74). Las glicoproteínas se asocian formando complejos proteicos, siendo gM/gN el más abundante. Las glicoproteínas desempeñan un papel fundamental en la entrada virus a las células. Estas glicoproteínas inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, por lo que se están utilizando en el desarrollo de las diferentes vacunas^{3,4}.

Alphaherpesvirinae*Simplexvirus*

Virus Herpes Simple tipo 1

Virus Herpes Simple tipo 1

Varicellovirus

Virus Varicella-zoster

Betaherpesvirinae*Cytomegalovirus*

Citomegalovirus (CMV)

Roseolovirus

Herpesvirus Humano tipo 6

Herpesvirus Humano tipo 7

Gammaherpesvirinae*Lymphocryptovirus*

Virus de Epstein-Barr

*Rhadinovirus*Herpesvirus humano tipo 8

Tabla 1. Clasificación de los herpesvirus humanos³

2.2 Epidemiología

Aunque la distribución del CMV es mundial, existen diferencias importantes en la prevalencia de la infección gestacional y congénita entre países. En los países industrializados, en torno al 50% de las mujeres en edad fértil son seronegativas frente al CMV¹. En esta población el 1-7% de las mujeres seronegativas van a infectarse por CMV cada año¹. En los países en vías de desarrollo la infección por CMV se produce normalmente en los primeros años de la vida y un alto porcentaje de las gestantes son seropositivas¹. La prevalencia de la infección congénita también varía en función del país, e incluso se encuentran diferencias relevantes entre regiones de un mismo país, en función de la renta familiar y de otros factores socioeconómicos⁶. En los países industrializados, la prevalencia oscila entre un 0,14 % y un 0,7% de los recién nacidos^{1,6-10}. En los países en vías de desarrollo, donde el porcentaje de gestantes inmunes es mayor, la infección fetal se produce en muchos casos tras una reinfección materna por una cepa diferente de CMV o por una reactivación de una infección previa^{1,11}. En estos países, la prevalencia de mujeres en edad reproductiva que son seropositivas frente a CMV puede alcanzar el 90% ¹² y la prevalencia de CMVc oscila entre el 1 y el 5% ^{1,13,14}. En España, la prevalencia de mujeres seropositivas frente a CMV en el grupo de edad de 21 a 30 años es del 69,4% y en las mujeres entre 31 y 40 años del 79,1%, y más del 40% de los niños han pasado la infección antes de los 6 años¹⁵. El único estudio realizado en España sobre prevalencia de esta infección congénita en un número importante

de recién nacidos se desarrolló en el Hospital de Móstoles y se hizo el cribado a más del 75% de los niños nacidos en dicho centro, durante dos años consecutivos. Se encontró una prevalencia del 0,3%⁹. En España, se han realizado otros estudios de prevalencia de CMVc en diferentes grupos de riesgo, como hijos de madre infectada por el VIH y prematuros. La prevalencia en España de CMVc entre los hijos de las madres infectadas por el VIH ha descendido desde el inicio del uso del "*Tratamiento Antiretroviral de Gran Actividad*" (TARGA), pasando de un 9,2% (IC95%: 4,7-15,8) en el periodo 1987-1996 (periodo pre-TARGA) a un 1,3% (IC95%: 0,2-4,3) en el periodo 1997-2003¹⁶. Este descenso es similar al observado en otros países industrializados desde la introducción del TARGA¹⁷. La prevalencia de CMVc es mayor entre los niños infectados por el VIH que entre los expuestos no infectados y el porcentaje de CMVc sintomáticos también es mayor en estos niños, por lo que se recomienda el cribado sistemático de esta infección¹⁶.

La prevalencia de infección congénita en niños prematuros también ha sido estudiada en España. En un estudio realizado en menores de 32 semanas y/o 1500 gr en Barcelona se detectó una prevalencia de CMVc de un 2,3%¹⁸. Turner *et al* encontraron que la prevalencia de CMVc era similar en los menores de 1500 y en los recién nacidos a término, con un 0.39% (CI95%: 0,25–0,62) de infección congénita en prematuros¹⁹. En este estudio, los prematuros con CMVc presentaban en un elevado porcentaje de los casos hipoacusia o alteraciones neurocognitivas ¹⁹.

2.3 Inmunología de la infección congénita

Las primeras células inmunes fetales aparecen en el saco vitelino embrionario en torno a la tercera o cuarta semana, en forma de precursores de granulocitos y macrófagos y de precursores eritroides. Las células inmunes migran desde el saco vitelino al hígado en torno a la sexta semana de gestación. En el hígado, los precursores se diferencian a macrófagos, granulocitos y a linfocitos pre-T y pre-B. El bazo se desarrolla en torno a la semana decimoctava de gestación y las primeras células T y B maduras aparecen en la circulación fetal en la semana decimosexta²⁰.

2.3.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata desarrolla un papel fundamental en la prevención de la infección congénita por CMV.

Células NK

Las células NK van a destruir las células infectadas por CMV mediante varios mecanismos: la muerte celular mediada por perforinas, la apoptosis mediada por Fas ligando y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos²¹. Estas células producen citoquinas y regulan la respuesta inmune a través de su interacción con las células dendríticas. Durante la gestación se desarrolla un estado de “inmunotolerancia” para evitar el rechazo fetal y durante el primer trimestre, en el tejido endometrial, se encuentran unas células denominadas “*uterine NK cells* o *uNK*”. Son la principal célula inmunitaria endometrial en ese momento

de la gestación y presentan una menor capacidad citotóxica que las otras células NK, precisamente para contribuir a ese estado de inmunotolerancia que hemos comentado.

En algunos estudios, la presencia de una infección congénita por CMV se ha relacionado con una respuesta NK alterada. Existen una serie de receptores de NK que transmiten señales de activación o inhibición tras reconocer moléculas de las células con las que interactúa. En humanos, se han identificado varios grupos de receptores de NK: los KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*), los receptores de citotoxicidad natural (NCR) y las moléculas de la familia NKG2. Se ha descrito que el inmunofenotipo NKG2 está aumentado en los niños con infección congénita y en aquellos con una infección sintomática^{21,22}.

Células fagocíticas

Aunque no se conoce correctamente el papel que tienen los granulocitos en la prevención de la infección fetal, se ha comprobado mediante el estudio de las placentas que se acumulan granulocitos en las vellosidades coriales de los fetos infectados²¹.

Toll like receptors

Los polimorfismos en TLR2 se han asociado a una mayor gravedad de la infección por CMV en trasplantados²³, aunque este hecho no ha podido comprobarse en la infección congénita. En modelos celulares se ha visto que TLR2 participa en el proceso inflamatorio que se produce a nivel placentario en

presencia del virus²⁴. TLR3 interacciona con el CMV mediante la unión de las moléculas de ARN virales que se producen durante la replicación²¹. Los pacientes con la variante L412F del TLR3 presentan una mayor susceptibilidad a las infecciones por CMV, debido a una disminución de la producción de IFN γ y TNF α , aunque esta hipótesis no se ha demostrado en la infección congénita.

TLR7 está implicado en la respuesta a la infección por CMV, aunque su papel tiene que ser estudiado.

Citoquinas, quimiocinas y defensinas

Durante la gestación, se produce un aumento de diversas citoquinas, como IL10 que tiene un papel antiinflamatorio y que también se relaciona con un aumento de susceptibilidad a la infección por el CMV²¹. Otras citoquinas, como son IL17, IL18, IL23, IL1 β y TNF α , parecen tener asimismo un papel importante en la transmisión vertical de las infecciones virales. Las quimiocinas CCL2, CCL4 y CXCL10 están aumentadas en el líquido amniótico de los fetos infectados por CMV, frente a niveles normales en fetos expuestos pero no infectados²⁵.

2.3.2 Inmunidad adaptativa

Se ha descrito que la infección por CMV en niños produce una anergia de células T, que altera la vía TCR/CD3 y ocasiona un estado de inmunodeficiencia secundaria²⁶. A continuación, se analiza cómo el CMV modifica en la madre y el feto la respuesta inmune.

Linfocitos T CD4

Se ha encontrado que las madres que transmiten la infección al feto tienen una respuesta linfoproliferativa de CD4 peor que las no transmisoras^{27,28}. También se ha postulado que las madres que transmiten la infección presentan cifras más bajas de linfocitos T “naive” y la presencia de este inmunofenotipo también se relaciona con un mejor control de la viremia ²⁹.

Se ha evaluado el papel que tiene la respuesta inmune fetal mediada por CD4 en la transmisión de la infección y en la sintomatología del niño. Aunque no parece tener un papel relevante en la transmisión viral al feto, si podría relacionarse con la gravedad de los síntomas fetales²¹.

Linfocitos CD8

La infección primaria por CMV produce una diferenciación de las células CD8 naive, que se convierten en células efectoras o de memoria, capaces de secretar IFN γ y de lisar las células infectadas. Durante la primoinfección materna, se produce una respuesta CD8 en la gestante, similar a la que se produce en otros adultos sanos. También el feto presenta una respuesta CD8 desde la semana 22 de gestación²¹.

Anticuerpos

La protección que generan los anticuerpos frente a la infección por CMV es importante pero incompleta, ya que es posible la reinfección de personas previamente seropositivas frente a CMV. Los anticuerpos desempeñan un papel

relevante en evitar la infección fetal, mediante la neutralización directa del virus y también tienen un papel protector a nivel placentario, mediante diversos mecanismos. Cuando la avidez de los anticuerpos maternos es baja o la actividad neutralizante de los mismos es pobre, el riesgo de infección fetal es mayor^{21,30,31}. La infección gestacional por CMV produce alteraciones placentarias que son reversibles con la administración de gammaglobulina hiperinmune, por lo que se postula que el tratamiento precoz podría limitar la afectación fetal³¹.

2.4 Patogenia de la infección congénita por citomegalovirus

El único reservorio conocido del CMV humano son las personas, aunque existen CMV no humanos que infectan a otros animales. La infección en el huésped inmunocompetente se produce normalmente a través de las mucosas de la vía aérea superior, la mucosa genital o la mucosa gastrointestinal, con una fase virémica posterior en la que se disemina por todo el organismo⁴. Durante la infección natural, el virus se replica lentamente en las células de los distintos epitelios glandulares, las células musculares lisas, en los hepatocitos y en los granulocitos y macrófagos. Tras 2-4 semanas desde la infección se detecta la presencia del virus en diversos fluidos corporales como la saliva, la orina, las secreciones genitales e incluso en la leche materna y frecuentemente, en la sangre. La detección del CMV en los fluidos corporales puede prolongarse durante meses o años tras la infección primaria ^{3,4}.

La infección fetal se produce por la transmisión transplacentaria del virus tras una infección materna primaria o bien tras la reactivación de un virus latente o una reinfección por una cepa diferente. La infección fetal tras una reactivación o una reinfección puede ser la causa de un porcentaje importante de casos de CMVc, especialmente en los países de una alta seroprevalencia^{1,13}. Aunque muchos casos de reactivación o reinfección son más leves que los producidos tras una infección primaria, también pueden presentar una afectación fetal grave^{13,32}. Algunos estudios proponen incluso que el riesgo de síntomas al nacer es similar en los casos producidos tras una infección primaria y en aquellos infectados por madres seroinmunes³². El riesgo de infección fetal tras una primoinfección materna es mayor en el tercer trimestre que en los dos trimestres previos^{30,33,34}. Los porcentajes de transmisión al feto tras la primoinfección en la gestante oscilan entre un 30,2% y un 42,2% en el primer trimestre 38,2-43,5% en el segundo y un 64,5 -73,3% en el tercero (16-18). En el caso de las reinfecciones y reactivaciones la tasa de transmisión al feto es del 1-2%³⁵.

2.4.1 Placenta

El CMV se replica en el citotrofoblasto ocasionando la liberación de factores que alteran el desarrollo normal placentario y la diferenciación celular³¹. Se produce el descenso de la expresión de integrinas $\alpha 1\beta 1$ y de metaloproteinasa 9 (MMP-9), necesarias para la invasión placentaria³⁶. Esta alteración de la invasión

placentaria aumenta el riesgo de presentar un aborto espontáneo. Se produce también un aumento del depósito de colágeno en las células endoteliales infectadas mediante la activación del TGF- β , reduciendo el flujo en los vasos útero-placentarios³⁷. La situación prolongada de hipoxia por la infección, la inflamación y la fibrosis a nivel placentario aumenta la proliferación de las vellosidades coriales. Como consecuencia de estos mecanismos, al comparar la placenta de gestantes con una infección primaria por CMV frente a gestantes no infectadas, se encuentra un marcado engrosamiento placentario, similar al que se encuentra en gestantes fumadoras o en gestaciones en gran altitud ³¹. Se cree que gran parte del daño fetal producido por el CMV se ocasiona por estas alteraciones placentarias.

2.4.2 Sistema nervioso central

El CMV tiene un especial tropismo por las células del SNC fetal³⁸. La afectación de las células precursoras neurales fetales va a modificar su capacidad de autorrenovación y la normal diferenciación y migración de los neuroblastos, que son fundamentales para la formación de las estructuras y desarrollo de las funciones normales del SNC. En la afectación del SNC fetal, se van a ver implicadas diferentes tipos celulares:

Los astrocitos, que constituyen un 70% del tejido cerebral, permiten la replicación del CMV. En cultivos celulares de astrocitos humanos, se ha demostrado replicación viral³⁸. Por el contrario, las neuronas humanas

diferenciadas son resistentes a la replicación viral al igual que la microglia, que son los macrófagos diferenciados que se encuentran permanentemente en el cerebro³⁸⁻⁴⁰. Los precursores de las células neuronales se localizan principalmente en la zona subventricular y en la zona subgranular del hipocampo y tienen la capacidad de migrar, proliferar y diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. El CMV infecta preferentemente las células del área ventricular o subventricular y podría existir la posibilidad de que infecte a las células precursoras de esas áreas^{38,41,42}. Varios estudios han demostrado que el CMV es capaz de replicarse en las células precursoras neurales^{38,40}. Esta infección inhibe su diferenciación en neuronas y astrocitos, y también se altera su proliferación mediante cambios en el ciclo celular^{38,40}. La infección de los precursores se traslada hacia las estructuras corticales mediante la propia migración de celular⁴³. La infección de las células precursoras neurales no sólo afecta el desarrollo prenatal, sino que también se ve afectado el desarrollo postnatal del SNC. La infección fetal puede inducir la producción de diversos mediadores inflamatorios, como citocinas, radicales oxidativos y otros neurotóxicos, que ocasionan un efecto citotóxico directo sobre las células neuronales inmaduras, y una alteración del microambiente normal tisular. Todo ello va a ocasionar la lisis de los progenitores neuronales en el área gris subventricular, con vasculitis, destrucción de los vasos de soporte y un cuadro de meningoencefalitis^{38,39}. La extravasación de sangre por afectación microvascular genera las características calcificaciones

periventriculares que aparecen en algunos pacientes. Las neuronas diferenciadas tienen una sensibilidad mucho menor a la infección por el CMV, presentando mecanismos de inhibición de la replicación viral. Este hecho explica, en parte, el bajo riesgo de afectación del SNC en pacientes inmunocompetentes en la infección postnatal o la menor afectación del SNC del feto durante las últimas semanas del embarazo.

La apoptosis es el mecanismo por el cual las células dañadas o infectadas son eliminadas de los tejidos mediante un proceso de autodestrucción. Este procedimiento es fundamental en la organogénesis del SNC y tiene un papel relevante como mecanismo de defensa frente a las infecciones virales. El CMV ha desarrollado mecanismos para retrasar la apoptosis celular. Las proteínas virales IE1 e IE2, que son reguladores de la replicación viral, inhiben la apoptosis. La replicación viral del CMV en los astrocitos induce la producción de p53, que participa en el proceso de apoptosis. IE2 secuestra la p53 citoplasmática, produciendo un retraso en la apoptosis. El CMV presenta otros genes antiapoptóticos como UL36 y UL37. La vía extrínseca de la apoptosis parece tener un papel regulador en el desarrollo normal del SNC. En la retina, la infección por CMV produce una activación de FasL que induce la apoptosis de los linfocitos T.

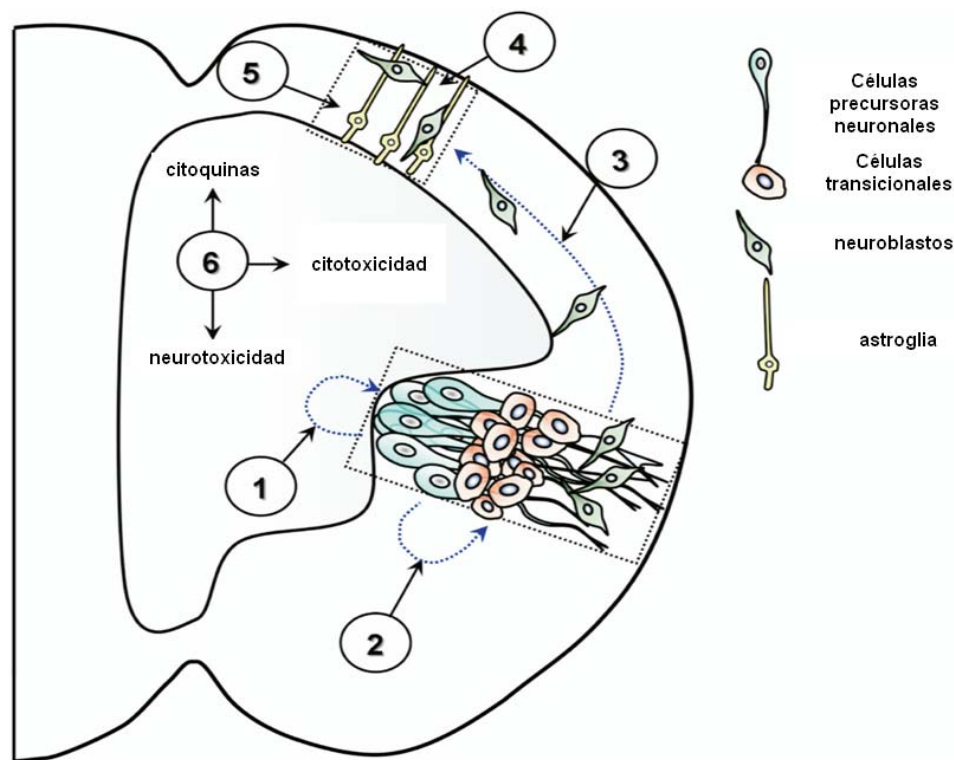


Figura 1. Mecanismos patogénicos de la infección del SNC fetal. Extraída y adaptada de Cheeran 2009³⁸. Esquema de los mecanismos neuropatogénicos de la infección fetal por CMV.

1: La infección de las células precursoras neurales puede alterar la capacidad de autoregeneración de estas células. 2: El CMV trastorna la diferenciación de las células precursoras a células transicionales y a neuroblastos. 3: El CMV modifica el patrón normal de migración de los neuroblastos durante el desarrollo cerebral y cerebelar, inhibiendo la migración a las estructuras cerebrales más distales. 4: La alteración de la migración ocasiona anomalías de la estratificación neuronal del neocórtex. 5: El CMV también altera las células gliales que participan ordenando la estratificación neuronal. 6: La infección puede desencadenar un proceso inflamatorio que incluye citocinas, radicales oxidativos y otros neurotóxicos y se produce un cuadro de citotoxicidad directo.

2.4.3 Oído

La fisiopatología de la hipoacusia en la infección congénita por CMV está relacionada con la anatomía del oído interno. La cóclea es una espiral ósea que

gira sobre sí misma y su luz se encuentra dividida por tres cámaras espirales: la escala vestibular, la escala timpánica y la escala intermedia (situada entre las dos previas). La escala intermedia contiene la endolinfa (con alto contenido en potasio y bajo en calcio y sodio, y que presenta potencial eléctrico mantenido) mientras que las otras dos escalas contienen a la perilinfa. En la pared de la escala intermedia se encuentra un plexo vascular denominado estría vascular. Esta estructura participa en la homeostasis iónica en la endolinfa mediante unas bombas de potasio que se encuentran en este epitelio. Sobre la membrana inferior de la escala intermedia se encuentra el órgano de Corti, cuya función es la recepción de los estímulos auditivos. Este epitelio especializado está constituido por células ciliadas y por células de sostén. El potasio activa las células ciliadas del órgano de Corti, implicadas en traducir las ondas sonoras en impulsos eléctricos, que se transmiten al ganglión espiral y posteriormente al núcleo coclear ⁴⁴.

El conocimiento de la fisiopatología de la hipoacusia en el CMVc es aún muy limitado. Este hecho se debe al escaso número de estudios histopatológicos que se han realizado en fetos y recién nacidos hasta la fecha. En los fetos estudiados, es frecuente encontrar afectación de la estría vascular, una estructura fundamental para mantener la homeostasis eléctrica en la endolinfa^{4,44}. La infección fetal por el CMV destruye los mencionados canales iónicos de la estría vascular. La alteración iónica y eléctrica que se produce hace que las

células ciliadas del órgano de Corti no se activen correctamente y no transmitan la señal y además se produce una degeneración de las mismas. También se encuentran células con CMV en la membrana de Reissner, que forma parte de la escala vestibular, y se produce un desequilibrio iónico y eléctrico entre la endolinfa y la perilinfa^{4,44}. Sin embargo, en el modelo murino se ha comprobado que las células infectadas se localizan en el ganglio espiral, el ligamento espiral, la estría vascular y la médula ósea del hueso temporal y no se han encontrado células infectadas en el Órgano de Corti, ni tampoco una alteración histológica franca⁴⁵. En este modelo, se pudo relacionar el desarrollo de la hipoacusia con la presencia de células infectadas en la estría vascular y en el ganglio espiral, con una pérdida de neuronas del ganglio espiral y un proceso inflamatorio que se produce a nivel de la cóclea⁴⁵. Se han encontrado linfocitos CD8 activados que participan del proceso inflamatorio y que son capaces de producir un daño directo a las células ciliadas, ocasionando la pérdida de células del neuroepitelio y llegando incluso a la fibrosis⁴. Se ha descrito también una laberintitis crónica con aislamiento de CMV en la endolinfa^{46,47}. Algunos estudios sugieren que la infección congénita por CMV puede ocasionar también una lesión cromosómica directa o modificar la expresión génica. Algunos loci cercanos al lugar donde típicamente se producen estas “roturas” están relacionados con síndromes de sordera hereditaria (DFNA7 y USH2A)⁴⁸.

2.4.4 Otros órganos

En muchos casos la afectación fetal es multisistémica. En el hígado se detecta infiltración linfoide periportal, ectasia biliar y células con cuerpos de inclusión en los conductos biliares e incluso necrosis de las células parenquimatosas. Estas células con inclusiones características pueden aparecer en diversos órganos, como glándulas salivares, páncreas, pulmón, riñones, médula ósea y corazón, acompañadas en algunos casos de un infiltrado inflamatorio o incluso de necrosis. Un hallazgo histológico característico de la infección por el CMV es la existencia de células en "ojo de búho", que son células de gran tamaño con núcleos prominentes e inclusiones ovaladas o redondeadas, separadas de la membrana nuclear por una zona clara (figura 2).

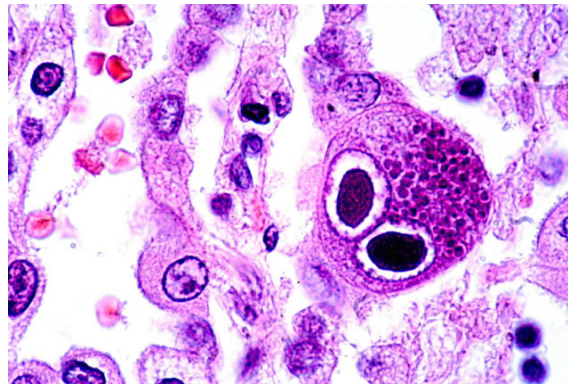


Figura 2. Muestra de tejido pulmonar. Células en "Ojo de Búho" características de la infección por CMV (X 480). Extraído de "Microbe Library", de la American Society for Microbiology.

<http://www.microbelibrary.org>. Autores: Danny Wiedbrauk y Joan Barenfanger.

2.5 Diagnóstico de la infección en la gestante y en el feto

2.5.1 Diagnóstico en la gestante

Cuando se produce una infección por CMV en una gestante no inmune, es de vital importancia confirmar este diagnóstico, pues todas las actuaciones posteriores que se realicen dependerán del diagnóstico inicial. El diagnóstico clínico es complicado ya que, en un porcentaje elevado de los casos, la infección materna es asintomática o presenta síntomas poco llamativos (fiebre, astenia, faringitis o hipertransaminasemia)^{30,49,50}. Incluso en los estudios prospectivos un tercio de las gestantes que presentan una infección por CMV no refieren síntomas¹¹. Existen otras dificultades a la hora de diagnosticar una infección primaria durante la gestación: en primer lugar es necesario establecer correctamente el momento exacto en el que se ha producido la infección, especialmente en aquellos casos en los que existen dudas sobre si se ha producido antes o durante la gestación. Se han descrito casos de transmisión al feto tras una primoinfección materna en las semanas previas a la concepción, pero el riesgo de infección fetal es mucho menor (4-8%) y en la mayor parte de los casos el recién nacido infectado está asintomático^{51,52}. En segundo lugar, existen problemas de interpretación de un resultado positivo de la IgM frente a CMV. Aunque la mayoría de los test comerciales de IgM frente a CMV presentan una alta sensibilidad (100%) y elevada especificidad (95%)⁴, pueden producirse falsos positivos por una reacción cruzada frente a otros virus como

el VEB o enfermedades autoinmunes¹¹. Por otro lado, la persistencia de una IgM positiva se puede prolongar durante más de un año tras una infección primaria^{11,50}. En los primeros 3 meses tras la infección se detectan niveles elevados de IgM y posteriormente se produce un lento descenso en los títulos. En algún caso de reactivación o de reinfección por una cepa diferente de CMV también se puede detectar una IgM positiva^{11,50}.

Conocer el momento aproximado en el que se ha producido la infección materna es fundamental a la hora de establecer el riesgo de transmisión de la infección al feto y la posibilidad de que el niño presente síntomas tras el nacimiento. Cuando se detecta una IgM y una IgG positivas en el embarazo y no se puede confirmar una seroconversión durante la gestación, se puede utilizar el test de la avidez para realizar una estimación aproximada del momento de la infección. La avidez de un anticuerpo se define como la fuerza de unión entre la molécula de inmunoglobulina y un antígeno multivalente. Se cuantifica mediante el porcentaje de la IgG que permanece unida al antígeno tras aplicar productos desnaturalizantes como la urea¹¹. Durante los primeros meses (3-6 meses) tras una infección por CMV se presentan anticuerpos IgG de baja avidez ($\leq 30\%$). Con el tiempo se van produciendo anticuerpos de mayor avidez. La presencia de anticuerpos de alta avidez ($> 65\%$) en el primer trimestre de gestación es indicativo de una infección previa a la gestación^{11,50,53} (figura 3). La detección de ADN de CMV mediante PCR en sangre materna tiene una utilidad limitada en el diagnóstico de la infección materna o en el

riesgo de transmisión de la infección al feto. Sólo el 33% de las gestantes con una infección primaria presentan DNA-CMV positivo en sangre en el momento de la infección⁵⁴.

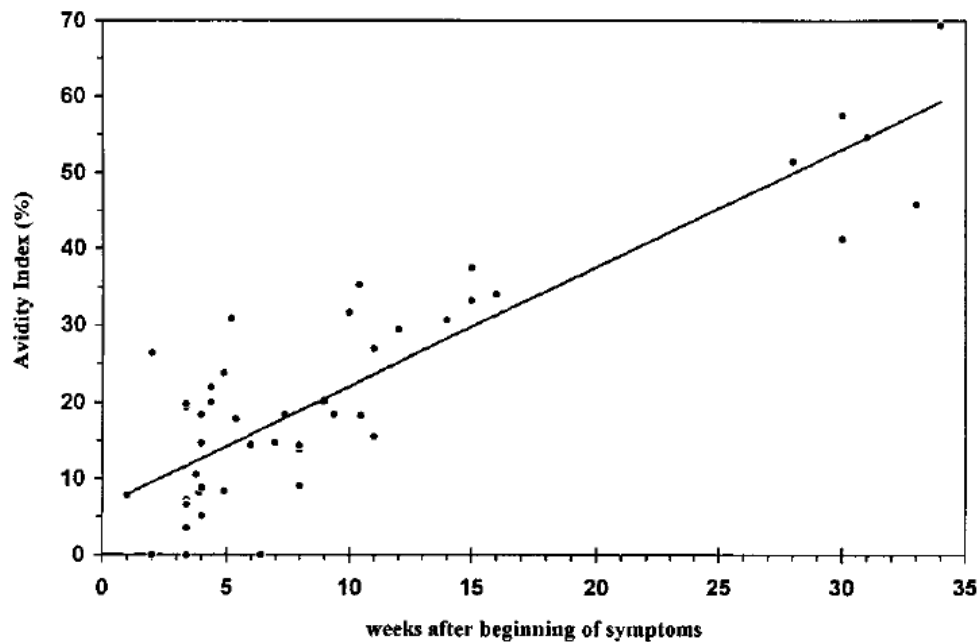


Figura 3. Evolución de la avidéz en función de las semanas transcurridas tras el inicio de los síntomas maternos. Autor: T. Lazzaroto⁵³

En un estudio realizado en gestantes jóvenes seropositivas de Alabama, hasta un 24% presentaban ADN-CMV en sangre en el momento del parto⁵⁵. La presencia intermitente de viruria y de CMV en sangre de mujeres seropositivas asintomáticas es un hecho frecuente y no parece tener relación con el riesgo de infección fetal⁵⁵.

2.5.2 Diagnóstico de la infección fetal

Un elevado porcentaje de las primoinfecciones maternas por CMV no presentan síntomas¹¹, por lo que en muchos casos el diagnóstico de la infección fetal se realiza tras la presencia de hallazgos compatibles en los controles ecográficos rutinarios. Las ecografías fetales rutinarias detectan la gran mayoría de los cuadros con afectación grave del SNC ^{11,49,50,54,56-58}. Sin embargo, muchos casos asintomáticos o con menor afectación del SNC pueden pasar desapercibidos en los controles ecográficos rutinarios. Los hallazgos que más frecuentemente se encuentran en la ecografía de los fetos infectados están recogidos en la tabla 2 ⁵⁹⁻⁶¹.

Crecimiento intrauterino retardado
Microcefalia
Ventriculomegalia
Quistes periventriculares
Calcificaciones intracraneales
Hipoplasia cerebelosa
Adhesiones ventriculares
Alteraciones de la sustancia blanca
Hiperecogenicidad intestinal
Hiperecogenicidad periventricular

Tabla 2. Hallazgos más frecuentes en la ecografía de los fetos infectados por CMV.

Para mejorar la capacidad diagnóstica y pronóstica, se ha desarrollado en los últimos años la técnica de la resonancia magnética fetal. La mayor sensibilidad de esta prueba para detectar alteraciones en el SNC permite ofrecer a los padres una estimación pronóstica más fiable que la ecografía. Sin embargo, también presenta algunas limitaciones. En primer lugar no se realiza de manera rutinaria en la gestación, por lo que en la mayoría de los fetos con CMVc sin alteraciones ecográficas no se efectuará dicha prueba. Por otro lado, la RMN fetal puede detectar alteraciones en la sustancia blanca y a otros niveles que son difíciles de interpretar durante el periodo fetal, y hay pocos estudios sobre el valor pronóstico a largo plazo de estos hallazgos^{60,62}.

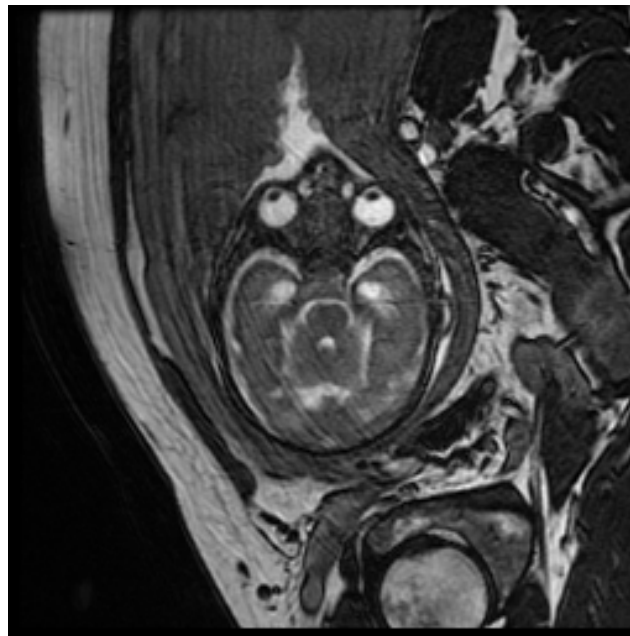


Imagen 1. Resonancia magnética de un feto infectado por CMV, con presencia de lesiones quísticas adyacentes a las astas temporales de los ventrículos laterales.

La detección de ADN del CMV en el líquido amniótico es la prueba de referencia para el diagnóstico de la infección fetal. Es necesario que la amniocentesis se realice a partir de la semana 20-21 de gestación y 6-8 semanas tras la infección materna para que el resultado sea valorable ⁵⁰. La detección de CMV en líquido amniótico mediante PCR presenta una alta sensibilidad y especificidad (90-98% y 92-100% respectivamente)^{11,49,50,58}. La tasa de complicaciones de la amniocentesis es baja, presentando menos de un 1% de pérdidas fetales y el riesgo de transmisión de la infección al feto secundaria a este procedimiento es baja⁵⁰. La cordocentesis también se utiliza para la confirmación de la infección fetal, aunque el riesgo de pérdida fetal es mayor y presenta una menor sensibilidad que la amniocentesis (85%)¹¹.

2.6 Clínica

El 10-15% de los niños con infección congénita por CMV presentarán síntomas al nacimiento.

2.6.1 Hepatomegalia y esplenomegalia

La hepatoesplenomegalia y las petequias son los hallazgos más frecuentes, que aparecen en torno al 60% de los casos sintomáticos. A veces, se encuentra una elevación de las transaminasas y colestasis en el 70-80% de los casos. La persistencia de la hepatoesplenomegalia es variable, pero en algunos casos persiste hasta el año de edad^{4,32}.

2.6.2 Ictericia

La ictericia es un hallazgo frecuente del CMVc, que aparece en el 40- 60% de los niños sintomáticos y que persiste durante varias semanas. Característicamente, la bilirrubina directa aumenta después de los primeros días de vida y no es infrecuente que alcance el 50% de los niveles totales de bilirrubina^{63,64}.

2.6.3 Petequias

Las petequias son un hallazgo característico de la infección congénita por el CMV, que actúa en la médula ósea provocando una disminución en la producción plaquetaria. Las petequias suelen ser puntiformes (la púrpura es menos frecuente) y aparecen típicamente unas pocas horas tras el parto y llegan a persistir varias semanas. El recuento plaquetario en los niños con rash petequeal suele oscilar entre 20000/ μ L y 60000/ μ L. En algunos casos se aprecian focos de eritropoyesis extramedular subdérmicos, en forma de lesiones papulosas violáceas, que recuerdan a un "pastel de arándanos" ("blueberry muffin").

2.6.4 Alteraciones neurológicas

Hasta el 50% de los niños con un CMVc sintomático presentan microcefalia al nacimiento⁶³. El 27% tienen letargia y/o hipotonía y en el 19% se encuentra alterada la succión^{63,64}. La existencia de convulsiones es menos habitual y aparece en el 7% de los casos^{63,64}. Un 46% de los niños con síntomas tienen hiperproteinorraquia (> 120 mg/dL) y diversos estudios lo relacionan con un

peor pronóstico neurológico⁶³. El 50-60% de los niños sintomáticos al nacimiento presentarán alteraciones neurocognitivas importantes a largo plazo⁶⁵⁻⁶⁹. En un estudio reciente se ha demostrado que un elevado porcentaje de los niños con CMVc tienen alteraciones vestibulares, aunque muchas veces pueden pasar desapercibidas⁷⁰.

2.6.5 Sordera neurosensorial

Es la principal causa de discapacidad asociada al CMVc y aparece de manera global en un 15% de los casos⁷¹. La sordera neurosensorial es mucho más frecuente entre los niños sintomáticos (30-65%) que en los niños asintomáticos (5-10%)^{71,72}, y en más del 50% de los casos se presenta de forma tardía, no siendo posible su detección en el cribado neonatal. Por este motivo, el seguimiento audiológico de estos pacientes es fundamental. La presentación es bilateral en un 50% de los casos. En un 50% de los niños con sordera se produce una progresión de la hipoacusia en los primeros años de vida^{71,72}. En torno al 8-10% de las hipoacusias en general y entre el 15-40% de las sorderas neurosensoriales moderadas o graves son producidas por el CMVc⁷³⁻⁷⁵.

2.6.6 Bajo peso al nacer

Aparece en el 50% de los niños sintomáticos. El 34% de estos niños son prematuros. Sin embargo, en los niños sin otros síntomas de CMVc, la prevalencia tanto de crecimiento intrauterino retardado como de prematuridad son mucho menores.

2.6.7 Alteraciones visuales:

La principal alteración oftalmológica asociada al CMVc es la coriorretinitis y, en muchos casos, asocia estrabismo o atrofia óptica. Hasta el 10-21% de los niños con CMVc sintomático van a presentar coriorretinitis, frente a un 2% de los niños asintomáticos^{63,76}. Aunque se han reportado casos aislados de desarrollo tardío de coriorretinitis en pacientes con una exploración oftalmológica normal previa, este hecho es poco frecuente en el CMVc, a diferencia de otras infecciones congénitas como la toxoplasmosis⁷⁶.

2.6.8 Neumonitis

Es poco frecuente entre los recién nacidos a término con CMVc, y afecta en torno al 1%. Esta complicación es más frecuente entre los recién nacidos prematuros con una infección postnatal por CMV⁴.

2.6.9 Alteraciones dentales

En ocasiones, sobre todo entre los pacientes con síntomas, se producen alteraciones del esmalte de la dentición primaria. Estos pacientes tienen un esmalte amarillento y una mayor tendencia a la presencia de caries⁴.

2.6.10 Infección asintomática

El 85-90% de los niños con CMVc no presentan síntomas al nacimiento, pero hasta el 10-15% desarrollan secuelas a largo plazo, principalmente hipoacusia neurosensorial. La gran mayoría de estas alteraciones aparecen en los primeros años de vida, aunque se han reportado casos tardíos de hipoacusia.

La frecuencia de alteraciones neurocognitivas tardías en los niños asintomáticos al nacimiento varía en los diferentes estudios. Algunos autores plantean que entre un 2-7% de los niños asintomáticos al nacimiento presentarán microcefalia a los 2 años de vida, con un grado variable de afectación neurocognitiva. Otros estudios no han puesto de manifiesto grandes diferencias intelectuales entre los niños con una infección congénita por CMV asintomática y hermanos o controles sanos no infectados^{4,66,68}

2.7 Diagnóstico de la infección congénita en el niño

2.7.1 Pruebas de imagen

Las alteraciones que se aprecian en la ecografía neonatal transfontanelar son muy similares a las obtenidas durante el periodo fetal. La afectación del SNC se manifiesta por calcificaciones, ventriculomegalia, alteraciones de la sustancia blanca y de la migración neuronal, adhesiones ventriculares y quistes periventriculares o microcefalia^{39,68,77,78}. Sin embargo, la sensibilidad de la ecografía neonatal en la detección de alteraciones de la sustancia blanca y la migración neuronal es baja, por lo que se plantea la posibilidad de realizar en todos los niños con CMVc una RMN craneal al nacer para poder descartar estas lesiones^{60,79,80}.

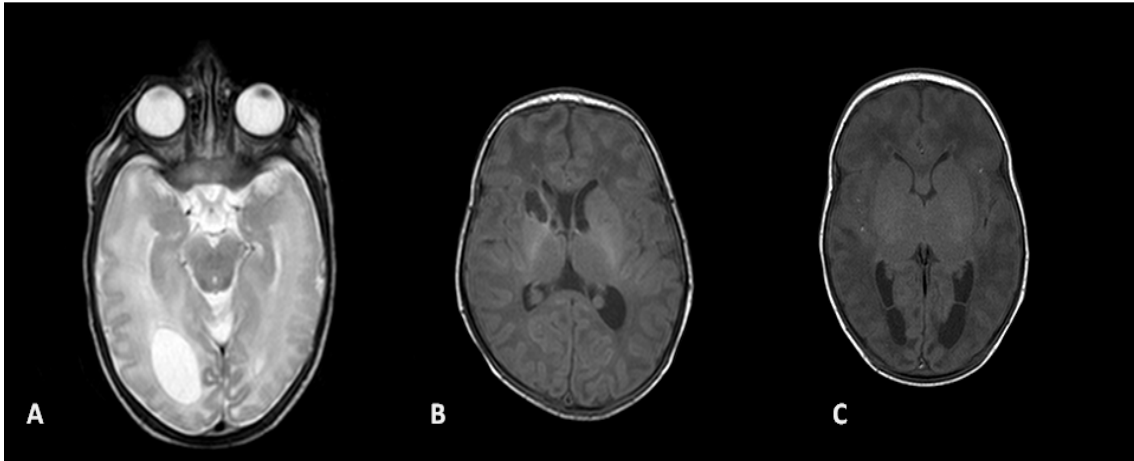


Imagen 2. Resonancia magnética craneal neonatal de tres pacientes con CMVc. Se describen a continuación los hallazgos que presentaron en la RMN. Paciente A. Quiste adyacente al atrio ventricular derecho, alteraciones de la sustancia blanca y de la migración neuronal. Paciente B. Lesiones quísticas en la proximidad a astas temporales y entre los núcleos caudado y putamen y afectación de sustancia blanca. Paciente C: Adhesiones ventriculares y alteración de la sustancia blanca.

2.7.2 Virología

El diagnóstico de la infección congénita por CMV en el neonato se realiza mediante el aislamiento viral o la detección de ADN mediante PCR en distintos fluidos corporales (orina, saliva, líquido cefalorraquídeo o sangre) durante las dos primeras semanas de vida^{4,81}. Una detección más tardía del CMV obedece a una transmisión en el canal del parto o durante el periodo perinatal, a través de la leche, otras secreciones o por transfusiones.

La prueba clásica de referencia es el aislamiento viral en cultivo tisular de fibroblastos de una muestra de orina. El largo periodo de demora para obtener los resultados (10-14 días) limita su utilización. Se han desarrollado métodos de detección viral rápida mediante anticuerpos monoclonales (denominados "*Shell*

Vial”) que muestran una elevada sensibilidad (94,5-95%) y especificidad (100%) comparados con el cultivo clásico, y que permiten obtener resultados en 24 horas⁸¹⁻⁸³. El cultivo mediante *Shell Vial* también presentó una alta sensibilidad y especificidad cuando se estudió su rentabilidad con muestras de saliva⁸³.

En los últimos años, se han desarrollado métodos de diagnóstico basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del ADN viral que permiten un diagnóstico más rápido y sencillo, con una alta sensibilidad y especificidad. La PCR en orina está sustituyendo en muchos centros a los cultivos virales tradicionales como método de elección para el diagnóstico de la infección congénita por CMV. Su sensibilidad es alta (98,5%-100%), a la vez que es una prueba rápida y sencilla de realizar^{83,84}. La posibilidad de realizar una PCR en la orina recogida en un papel de filtro, se ha evaluado como una técnica potencial de cribado, pero aún no se ha confirmado que tenga una sensibilidad suficiente⁸⁵.

Se ha estudiado la utilidad de la amplificación del ADN viral mediante PCR en sangre para el diagnóstico de la infección congénita por CMV. Aunque la sensibilidad de esta prueba es bastante alta (>85-90%), existen casos de infección congénita en los que no hay viremia y, por tanto, la PCR puede ser negativa^{81,86}. Existen técnicas de hibridación del ADN con una sensibilidad mayor que la técnica previamente citada, pero son difíciles de realizar en la mayoría de laboratorios⁸⁷.

La posibilidad de la utilización de muestras de saliva en el diagnóstico de la infección congénita ha sido investigada en los últimos años. Las muestras de saliva tienen la ventaja de que son mucho más sencillas de recoger que la orina y la sangre, y podrían ser usadas para realizar un cribado poblacional de CMVc. La sensibilidad y especificidad de la PCR en saliva rozan el 100%^{83,88,89}. Se han descrito falsos positivos en recién nacidos que recibían lactancia materna, por la excreción de CMV en la leche, y este hecho podría limitar su utilidad como técnica de cribado⁹⁰.

2.7.3 Diagnóstico retrospectivo

La ausencia en nuestro entorno de un cribado poblacional de la infección congénita por CMV hace que en muchas ocasiones sólo se diagnostiquen los casos que son sintomáticos al nacimiento. En muchos países sólo se consigue el diagnóstico de un 10%-15% de los casos, o se produce un diagnóstico tardío de los mismos⁹¹. El problema aparece cuando se detecta un caso clínicamente compatible con una infección congénita por citomegalovirus, fuera de las 2-3 primeras semanas de vida. En esa situación, la única forma de determinar si la presencia de CMV en sangre, orina o saliva es secundaria a una infección congénita o postnatal consiste en el análisis de muestras obtenidas en las primeras semanas de vida. En la mayoría de los casos, se realiza la detección de ADN del virus en la sangre seca de talón, recogida en el papel de filtro de las pruebas metabólicas (Tarjeta de Guthrie). La sensibilidad de esta técnica es muy

variable en función de los diferentes estudios consultados⁹². Boppana *et al* encontraron en un estudio realizado en más de 20000 recién nacidos una sensibilidad del 34%⁹³. Cuando la técnica se emplea en muestras obtenidas de niños de alto riesgo (síntomas compatibles con CMVc o hijos de madres con una historia de infección por CMV durante la gestación) la sensibilidad es más elevada (hasta el 95%)⁹⁴. La sensibilidad de esta prueba oscila en función del tipo de técnica empleada y de otros factores como la carga viral en el momento de la extracción, la cantidad de sangre de la muestra y el tiempo de almacenaje^{92,95}. Wang *et al* publicaron un meta-análisis en el que describen una sensibilidad global de la PCR en papel de filtro de un 84,4%, con una especificidad del 99,9%⁹². La sensibilidad de los estudios retrospectivos era mayor que en los estudios prospectivos, por lo que es posible que se presente un sesgo de selección. En nuestro medio, se ha realizado un estudio sobre la sensibilidad de esta técnica y sólo presentaba un 50%⁹⁶, por lo que con un resultado negativo no se puede descartar al 100% la infección congénita. En algunas sociedades como la japonesa, donde es frecuente que los padres conserven el cordón umbilical de los hijos tras el nacimiento, se ha utilizado esta muestra para realizar el diagnóstico retrospectivo⁹⁷.

Test	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Referencia bibliográfica
Cultivo de orina	Referencia	Referencia	
Shell-vial (orina)	94-95%	100	82,83
PCR en orina	98,8-100		83,84
PCR en sangre	85-100	100	86,98-100
PCR en saliva	100	99,9	83,88
IgM	30-70	----	86

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de las diferentes técnicas de diagnóstico de la infección congénita por CMV

2.8 Factores pronósticos de secuelas neurológicas y auditivas

2.8.1 Importancia del problema

Actualmente no es posible determinar con exactitud el riesgo de desarrollo de secuelas que presenta un feto o un recién nacido con CMVc. Poder determinar de manera certera este riesgo es fundamental para la toma de decisiones en la gestación o tras el nacimiento del niño³⁰. Durante la gestación, cuando se produce una infección materna o se confirma una infección fetal, los padres demandan una estimación sobre el pronóstico a largo plazo, que en muchos casos es difícil de realizar en ese momento³⁰. En los casos con una clara

afectación del SNC es sencillo elaborar un pronóstico clínico, sin embargo en aquellos fetos con nula o poca afectación ecográfica puede resultar complicado determinar si presentará hipoacusia o alteraciones neurológicas a largo plazo. Esto genera un importante estrés en los padres, que en muchas ocasiones tienen que decidir si interrumpir o no la gestación. Tras el nacimiento, la situación con los niños poco sintomáticos es similar pues no está claro si deben recibir tratamiento antiviral o no¹⁰¹⁻¹⁰⁶. Por tanto, es necesario estudiar y conocer los marcadores pronósticos fetales y neonatales de secuelas a largo plazo.

2.8.2 Factores pronósticos durante la etapa gestacional

Momento de la infección

El momento de la infección fetal es un factor determinante del riesgo de desarrollo de secuelas. Stagno *et al* encontraron que el riesgo de secuelas es mucho mayor entre los recién nacidos en la primera mitad de la gestación. Los niños asintomáticos en los que la infección se produjo a partir de la semana 27 presentaban un riesgo bajo de secuelas neurológicas³⁵. Zavattoni *et al* demostraron que el riesgo de secuelas es mayor en el primer y segundo trimestre de gestación y que los niños infectados en el tercer trimestre tenían menos síntomas⁵⁶. En este estudio, más del 70% de los infectados en el primer trimestre tenían síntomas al nacer⁵⁶. Enders *et al* confirmaron el bajo riesgo de los infectados en el tercer trimestre y el alto riesgo de secuelas en los niños

infectados en el primer trimestre³⁴. Sin embargo, hay un porcentaje no despreciable de fetos infectados en el primer y segundo trimestre que nunca manifestarán secuelas, por lo que es difícil para los padres tomar la decisión de interrumpir la gestación. El momento de la infección fetal no puede utilizarse de manera aislada para establecer un pronóstico sobre las secuelas.

Carga viral y otros biomarcadores en líquido amniótico y cordocentesis

Se ha estudiado la posible relación entre la carga viral en líquido amniótico y la existencia de una infección sintomática en el recién nacido^{11,107}. Las cargas virales bajas se relacionaron con una infección normalmente asintomática, pero cargas virales elevadas (>100.000 copias/mL) podían aparecer tanto en casos sintomáticos como en asintomáticos^{11,107,108}.

La cordocentesis permite conocer una serie de marcadores bioquímicos e inmunoviroológicos que se relacionan con el grado de afectación fetal. La utilidad de la $\beta 2$ microglobulina en sangre fetal para predecir el grado de afectación ha sido demostrada en varios artículos, y muestra una sensibilidad de > 90 % con una especificidad que alcanza el 100%¹⁰⁸. Un recuento plaquetario menor de 50.000 plaquetas/ μ L, un ratio elevado de IgM y una carga viral altas (>30.000 copias/mL) en sangre fetal también son marcadores bastante específicos de afectación fetal¹⁰⁸. Sin embargo, estos parámetros tienen varias limitaciones. En primer lugar, en nuestro entorno no se realiza un cribado serológico de las gestantes. En la mayoría de los casos el diagnóstico se efectúa

en fetos que ya presentan alteraciones ecográficas o en madres que han tenido síntomas compatibles, por lo que el resto de casos pueden pasar desapercibidos. Por otro lado, ambas pruebas son invasivas y tienen un riesgo de pérdida fetal que no debe ser desestimado.

Tratamiento durante la gestación con gammaglobulina hiperinmune

Se han desarrollado diversos estudios para encontrar un tratamiento eficaz para prevenir la infección y/o para limitar las secuelas a largo plazo. Nigro *et al* estudiaron la utilidad de la inmunoglobulina hiperinmune anti CMV (HIG) para reducir el porcentaje de niños con síntomas al nacimiento. En un grupo de 55 gestantes con una amniocentesis positiva se les ofreció la posibilidad de recibir tratamiento con HIG y 31 de ellas decidieron aceptar el tratamiento. Sólo un paciente (1/31; 3%) del grupo de niños tratados presentó síntomas tras el nacimiento, frente a un 50% (7/14) de los niños que no recibieron tratamiento con HIG ($p < 0,001$)¹⁰⁹. Este mismo trabajo puso de manifiesto la posible utilidad de la HIG en la prevención de la transmisión de la infección al feto. Se incluyó en este grupo a 102 mujeres con seroconversión confirmada frente a CMV durante el embarazo, que decidieron no realizarse una amniocentesis. El 16% de las mujeres que recibieron HIG frente al 40 % de las no tratadas tuvieron hijos infectados por CMV ($p=0,02$)¹⁰⁹. Sin embargo, este estudio no era aleatorizado y tenía importantes deficiencias de diseño.

Visentin *et al* realizaron un estudio en el que comparaban los niños que recibieron HIG durante la gestación con una cohorte histórica de niños no tratados¹¹⁰. La tasa global de secuelas (neurológicas y auditivas) en los primeros fue menor que en los no tratados; 4/31, 13% frente a 16/37, 43% ($p<0.01$). La hipoacusia neurosensorial también es menos frecuente entre los niños tratados con HIG (3/31, 10% vs 11/37, 30% ($p=0,07$)). Otro estudio que ha evaluado la utilización de la HIG durante la gestación es el realizado por Buxmann *et al*¹¹¹. Ninguno de los hijos de madres con una seroconversión durante el embarazo que fueron tratadas con HIG presentaron síntomas al nacer y sólo 8/39 se infectaron. Entre los cuatro niños con una infección confirmada durante la gestación (amniocentesis positiva) que fueron tratados con HIG, sólo uno exhibió síntomas al nacer¹¹¹. Ninguno de los tres estudios previamente citados fue aleatorizado.

Revello *et al* han realizado el primer estudio aleatorizado doble ciego sobre el papel preventivo de la HIG para evitar la infección fetal¹¹². Administraron HIG mensual a gestantes con una primoinfección por CMV. Encontraron una reducción no significativa ($p=0,13$) de la infección fetal en el grupo de tratados: 18/61 (30%) frente a 27/62 (44%). La tasa de sintomáticos al nacimiento fue similar en ambos grupos. No se aportan datos del seguimiento a largo plazo y se produjeron varias interrupciones de la gestación que pueden limitar la interpretación de los resultados sobre las secuelas a largo plazo.

Pruebas de imagen durante la gestación

La detección de lesiones en el SNC mediante la ecografía fetal es un predictor bastante específico del desarrollo de secuelas a largo plazo⁵⁹⁻⁶¹. Sin embargo, es una técnica poco sensible desde el punto de vista pronóstico, especialmente en los primeros dos trimestres de gestación⁵⁹⁻⁶².

La resonancia magnética fetal presenta una mejor sensibilidad y especificidad, aunque también tiene importantes limitaciones. En primer lugar, la sensibilidad diagnóstica es limitada en los dos primeros trimestres. Y en segundo lugar, puede detectar alteraciones leves de la sustancia blanca difíciles de interpretar desde un punto de vista pronóstico^{60,62}.

2.8.3 Factores pronósticos al nacimiento

Poder desarrollar un modelo pronóstico de secuelas a largo plazo en los recién nacidos con CMVc tiene una gran importancia. En primer lugar, se podría individualizar el tratamiento y el seguimiento de estos niños. No existe evidencia sobre si los niños asintomáticos o con pocos síntomas al nacimiento (sin hipoacusia ni alteraciones neurológicas) deben recibir tratamiento antiviral^{81,101,103-105,113}. Se han estudiado múltiples marcadores clínicos, microbiológicos y analíticos que permitan predecir el riesgo de secuelas. Este riesgo está mejor definido en los niños completamente asintomáticos, o en aquellos con muchos síntomas. En aquellos pacientes con síntomas leves sin

sordera o alteraciones neurológicas es más difícil predecir el riesgo de secuelas a largo plazo (figura 4)

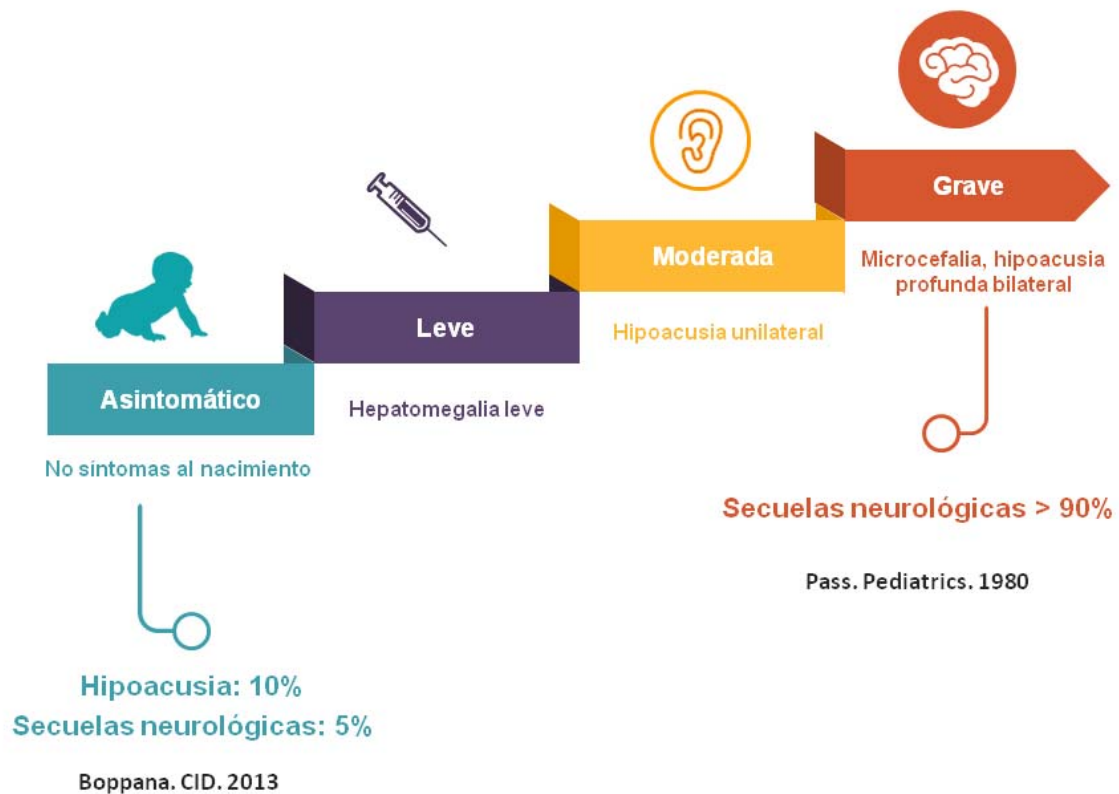


Figura 4. Riesgo de secuelas neurológicas e hipoacusia en función de los síntomas al nacer ^{68,114}.

Factores clínicos

La presencia en el CMVc de una afectación sistémica al nacimiento se ha relacionado con un mayor riesgo de hipoacusia. Boppana *et al* encontraron que el bajo peso al nacer o las petequias eran predictores independientes de hipoacusia, aunque no presentaban una asociación independiente con las

alteraciones neurológicas¹¹⁵. Uno de cada 3 niños sintomáticos al nacer presentará hipoacusia, frente a 1 de cada 10 niños asintomáticos⁷¹.

Pruebas de imagen

La presencia de alteraciones en las ecografías transcraneales son un marcador pronóstico conocido de secuelas a largo plazo (hipoacusia y alteraciones neurológicas)¹¹⁶. Sin embargo, aunque se considera el estudio básico inicial para evaluar la afectación del SNC y está recomendado en todos los niños con CMVc^{81,104,105}, un porcentaje importante de niños que desarrollan secuelas tienen una ecografía normal al nacimiento¹¹⁷. Noyola *et al* publicaron una alta sensibilidad del TAC para predecir la existencia de secuelas neurológicas (retraso mental o alteraciones motoras) en los niños con CMVc²². Sin embargo, el TAC craneal tiene varias limitaciones importantes, como son la radiación y la necesidad de sedación del paciente. Actualmente no se utiliza en la evaluación rutinaria de estos pacientes. La resonancia magnética tiene una capacidad limitada para detectar las calcificaciones cerebrales. Sin embargo, muestra una sensibilidad marcadamente superior que la ecografía en la detección de las lesiones de la sustancia blanca, alteraciones de la migración neuronal y lesiones parenquimatosas, y tiene una mejor capacidad predictiva en relación al desarrollo de secuelas que la ecografía^{80,117}. En nuestro hospital, se ha desarrollado una técnica para poder realizar resonancias magnéticas a neonatos sin sedación, con un alto porcentaje de éxito¹¹⁸.

Factores virológicos

Varios estudios han intentado relacionar la carga viral en diversos fluidos del organismo con el pronóstico auditivo y neurológico. Revello *et al* encontraron diferencias significativas en la carga viral en la sangre de los niños sintomáticos y los asintomáticos al nacer⁸⁶. Forner *et al* también encontraron una relación entre la carga viral en sangre al nacer y el desarrollo de hipoacusia. El riesgo de hipoacusia aumentaba por encima del 50% si el número de copias era mayor de 17.000/mL⁹⁹. En un estudio realizado por Lanari *et al*, el riesgo de secuelas era muy pequeño entre los niños con < 1.000 copias/mL en sangre, mientras que era mayor del 70% en los niños con más de 10.000 copias/mL⁹⁸. La misma relación entre la carga viral y el riesgo de hipoacusia se ha encontrado en las muestras obtenidas de sangre seca del talón¹¹⁹. Otros estudios también encontraron una correlación entre la carga viral y la presencia de hipoacusia en los niños¹²⁰. Sin embargo, Ross *et al* encontraron un bajo nivel predictivo de la carga viral en sangre en relación al desarrollo de hipoacusia¹²¹. Observaron que cargas virales menores de 3.500 copias/mL se relacionaban con un bajo riesgo de hipoacusia, pero cargas virales más altas no asociaban un riesgo mayor¹²¹. Se ha intentado establecer la misma relación entre la carga viral en orina al nacimiento y la presencia de hipoacusia. Boppana *et al* desarrollaron un estudio prospectivo en el que encontraron que el riesgo de desarrollo de hipoacusia era muy pequeño entre los niños con una carga viral baja en orina ($<5 \times 10^3$) y en sangre ($<1,0 \times 10^4$)¹²².

En resumen, no se ha podido establecer un punto de corte claro de carga viral en el que el riesgo de secuelas esté claramente aumentado, aunque parece claro que cargas virales bajas en sangre y en orina se asocian a un menor riesgo de secuelas.

Tratamiento antiviral

Otro factor pronóstico capaz de modificar el desarrollo de secuelas es el tratamiento antiviral postnatal. De nuevo en este punto aparecen diversas cuestiones que aún no están resueltas: ¿a quién debemos tratar?, ¿tratamiento intravenoso o tratamiento oral?, ¿cuál es la duración óptima del tratamiento antiviral?. Se han realizado dos ensayos clínicos aleatorizados sobre el tratamiento antiviral en niños. Uno de ellos ha demostrado que el tratamiento con ganciclovir intravenoso (12 mg/kg/día, en 2 dosis) durante 6 semanas disminuye el deterioro auditivo a los 6 y 12 meses en los niños con afectación del SNC y/o hipoacusia^{101,113}. No se logró demostrar un beneficio claro en cuanto a la disminución de las alteraciones neurológicas al año de edad por la pérdida de seguimiento de algunos pacientes del estudio^{101,113}. El valganciclovir es un profármaco del ganciclovir que se administra por vía oral, evitando la necesidad de un acceso venoso y de estancias hospitalarias prolongadas. Se ha establecido que una dosis de valganciclovir oral de 16 mg/kg/dosis es equivalente a 6 mg/kg/dosis de ganciclovir intravenoso¹²³.

Se ha desarrollado un segundo ensayo clínico aleatorizado doble ciego comparando 6 semanas frente a 6 meses de tratamiento con valganciclovir oral en niños sintomáticos, habiendo demostrado unos resultados a largo plazo moderadamente mejores en cuanto a la audición y al desarrollo neurológico¹⁰³.

3. JUSTIFICACIÓN

3 JUSTIFICACIÓN

La infección congénita por citomegalovirus es la primera causa de infección congénita en países industrializados y tiene un impacto social y económico enorme¹. En la Unión Europea, nacen anualmente 40.000 niños con CMVc, y de ellos 6.800 tendrán secuelas permanentes¹²⁴. En nuestro entorno, entre un 0,14% y un 0,7% de los niños nacen infectados por CMV^{1,6-9}. La mayor parte de los niños nacen asintomáticos o con pocos síntomas, pero hasta un 15-20% van a desarrollar secuelas a largo plazo, principalmente hipoacusia y alteraciones neurológicas. Conocer con exactitud el riesgo de desarrollo de secuelas que tiene un paciente ayuda a la familia y a los profesionales sanitarios a decidir los tratamientos mejores para estos niños.

4. HIPÓTESIS

4 HIPÓTESIS

Durante el periodo gestacional y al nacimiento existen una serie de factores de riesgo que se asocian con el desarrollo de secuelas a largo plazo en los niños con CMVc. La recogida sistematizada de estos factores de riesgo, mediante un estudio prospectivo multicéntrico, en un número elevado de pacientes, permitirá la elaboración de un modelo predictivo del riesgo de secuelas a largo plazo.

5. OBJETIVOS

5 OBJETIVOS

5.1 Principales

1. Estudiar los factores de riesgo gestacionales y neonatales que se asocian al desarrollo de hipoacusia y de alteraciones neurológicas en una cohorte de niños con infección congénita por CMV.
2. Construcción de un modelo predictivo del riesgo de desarrollo de hipoacusia y de alteraciones neurológicas en niños con infección congénita por CMV.

5.2 Secundarios

3. Describir las características epidemiológicas, clínicas y evolutivas de la enfermedad en una cohorte de niños con infección congénita por CMV.
4. Estudiar la asociación entre el resultado de la PCR frente a CMV en líquido cefalorraquídeo y el desarrollo de hipoacusia y de alteraciones neurológicas.
5. Determinar la asociación entre la presencia de vasculopatía lenticuloestriada en la ecografía transfontanelar y el desarrollo de hipoacusia y de alteraciones neurológicas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio

Estudio longitudinal prospectivo que se desarrolla en una cohorte nacional de niños con infección congénita por citomegalovirus.

6.2 Población y ámbito del estudio



En el año 2011 inicié con el apoyo de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP) y la Sociedad Española de Neonatología (SEN) un Registro Estatal de niños con una Infección Congénita por Citomegalovirus (REDICCMV). A través de dichas sociedades científicas, se ofreció a sus socios la posibilidad de participar como investigadores en el registro. Se constituyó un comité científico formado por el investigador principal del proyecto, junto al Dr. Rojo Conejo (Hospital 12 de Octubre), el Dr. Baquero-Artigao (Hospital La Paz) y el Dr. Noguera Julián (Hospital Sant Joan de Déu). Este comité se encargó de la dirección científica de la red y de aprobar y supervisar los trabajos de investigación que se han desarrollado durante estos años.

En enero del 2015, treinta y cuatro hospitales (figura 5) y 59 investigadores habían sido incluidos en el estudio. Se desarrolla una página web (www.cmvcongenito.es) de información para padres y profesionales sanitarios y que funciona como enlace para la base de datos online (figura 6)



Figura 5. Mapa de centros participantes en la red REDICCMV



Figura 6. Página web de REDICCMV (www.cmvcongenito.es)

Se incluyen en el estudio una cohorte longitudinal de niños con infección congénita por CMV, con diagnóstico confirmado microbiológicamente, reclutados en los 34 centros participantes. En España, no se realiza el cribado sistemático de la infección congénita por CMV en el recién nacido. En un gran porcentaje de los casos, los pacientes se diagnosticaron tras presentar signos y síntomas compatibles con esta infección durante el periodo gestacional o en el periodo neonatal. Otros pacientes se diagnosticaron retrospectivamente por presentar síntomas compatibles fuera del periodo neonatal, principalmente hipoacusia o alteraciones neurológicas.

6.3 Base de datos



Se elaboró una base de datos online utilizando el software REDCap (Research Electronic Data Capture), desarrollado por la Universidad de Vanderbilt (<http://project-redcap.org>)¹²⁵. El Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre fue aceptado en la red internacional de colaboradores de REDCap. Dicho software se instaló en los servidores del instituto para que esté disponible para cualquier investigador del hospital. REDCap permite el desarrollo por parte del propio investigador de bases de datos online multientrada, ideales para llevar a cabo estudios multicéntricos, como era nuestro caso.



Figura 7. Captura de pantalla de la base de datos online creada mediante REDcap.

6.4 Periodo del estudio

El registro comienza a incluir pacientes en el año 2011. Se incluyó a aquellos niños diagnosticados de infección congénita por CMV nacidos a partir de enero de 2011, hasta el 1 de mayo de 2015, en los hospitales participantes del estudio.

6.5 Definiciones

- Se consideró *primoinfección materna por CMV durante la gestación* cuando se produjo una seroconversión de la IgG de una gestante previamente IgG negativa. La existencia de una IgG y una IgM positivas frente a CMV, con una baja avidez de la IgG (<30%) durante

la gestación también se consideró una primoinfección materna por citomegalovirus.

- Se definió la *infección fetal por CMV* como la detección del virus mediante cultivo o por PCR-CMV en líquido amniótico o en la sangre fetal.
- Se consideró un diagnóstico confirmado de *infección congénita por CMV* si se detectaba el virus en un cultivo viral o una PCR-CMV positiva en cualquier muestra de fluidos (orina, saliva, sangre o líquido cefalorraquídeo) extraída en los primeros 14 días de vida. También se consideró diagnóstica la presencia de una IgM o una antigenemia positiva frente a CMV en los primeros 14 días de vida.
- Fuera del periodo neonatal sólo se aceptó el diagnóstico de *infección congénita por CMV* si la PCR-CMV fue positiva en al menos una de las muestras biológicas almacenadas (principalmente en la sangre seca de la tarjeta de Guthrie del cribado metabólico o en la sangre de cordón) que fueron extraídas en los primeros 14 días de vida.
- En relación al momento del diagnóstico, se consideró un *diagnóstico fetal* cuando se confirmó la infección del feto durante la gestación, un diagnóstico *neonatal* si se realizó durante los primeros 14 días de vida y un diagnóstico *retrospectivo* cuando el diagnóstico se realizó fuera de los primeros 14 días de vida, utilizando muestras almacenadas.

- Se definió una *exploración física alterada al nacer* como el hallazgo de al menos una de las siguientes alteraciones objetivadas por un pediatra al nacimiento:
 - Microcefalia: Perímetro craneal < -2 de Z score para su edad gestacional y sexo
 - Convulsiones
 - Esplenomegalia: Presencia de esplenomegalia palpable
 - Hepatomegalia: Presencia de hepatomegalia palpable
 - Hipotonía o succión pobre
 - Ictericia al nacimiento
 - Presencia de petequias o púrpura
 - Bajo peso para la edad gestacional: (< -2 Z score de peso al nacimiento para su edad gestacional y sexo)
 - Otras alteraciones compatibles con CMVc
- Se definió una *analítica alterada al nacimiento* como el hallazgo de al menos una de las siguientes alteraciones en la primera analítica (durante la primera semana de vida):
 - Trombocitopenia: menos de 100.000 plaquetas / μ L
 - Neutropenia: menos de 500 neutrófilos/ μ L
 - Anemia: hemoglobina menor de 9,5 g/dL en pretérmino o < 8 g/dL en niños a término
 - GPT mayor de 80 UI/L

- Bilirrubina directa mayor de 2 mg/dL.
- Se consideró una *infección sintomática al nacimiento* cuando existía alguna de las siguientes alteraciones:
 - Una exploración física alterada
 - Una analítica alterada al nacimiento
 - Una hipoacusia (> 25 dB) en al menos uno de los dos oídos
 - Coriorretinitis en el fondo de ojo
 - Una alteración compatible con un CMVc en las pruebas de imagen neonatales (RMN o ecografía transfontanelar neonatal) (ver aparatado). La vasculopatía lenticuloestriada aislada no se consideró una alteración patológica en la prueba de imagen.
- Hipoacusia: Se definió la hipoacusia como un umbral de respuesta igual o mayor a 25 dB en al menos un oído en los PEATC.

6.6 Variables

6.6.1 Marco general

Para intentar homogeneizar al máximo el manejo diagnóstico y terapéutico de los niños incluidos, se utilizó como protocolo general de referencia el "*Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus*"⁷⁹.

6.6.2 Variables gestacionales

Se recogieron diferentes variables epidemiológicas y clínicas de las gestantes:

Edad materna al parto, número de embarazos previos, número de abortos previos, edad gestacional en el momento de la infección fetal; país de nacimiento de la madre, otros hijos menores de 3 años en el momento del parto, hijos que acuden a guardería, trabajo materno con niños (maestra, pediatra), contacto conocido con CMV durante la gestación, inmunodeficiencia materna, tipo de inmunodeficiencia (VIH, inmunodeficiencia primaria, trasplante de órgano sólido, trasplante de progenitores hematopoyéticos, fármacos inmunosupresores). También se recogieron los síntomas compatibles con una infección por CMV durante la gestación, si la gestación fue gemelar o no, la edad gestacional al parto, si se produjo una primoinfección materna y las serologías gestacionales frente a CMV en cada trimestre, junto a la avidez de la IgG.

6.6.3 Amniocentesis y cordocentesis

Se recogió la fecha de realización, resultado de la PCR-CMV y carga viral tanto de la amniocentesis como de la cordocentesis.

6.6.4 Pruebas de imagen fetales

Se recogieron los hallazgos ecográficos compatibles con una infección fetal por citomegalovirus^{4,59-62}.

En el seguimiento habitual de la gestante en nuestro país se realiza al menos una ecografía fetal en cada trimestre. Se estudiaron los hallazgos en la primera ecografía fetal que se realizó en cada trimestre (tabla 4).

Crecimiento intrauterino retardado
(<-2 Z score para su edad gestacional)
Microcefalia (-2 < Z score)
Ventriculomegalia
Quistes periventriculares
Calcificaciones intracraneales
Hidrocefalia
Aumento de cisterna magna
Lisencefalia y otras alteraciones de la migración
Hipoplasia cerebelosa
Lesiones parenquimatosas
Adhesiones ventriculares
Alteraciones de la sustancia blanca
Oligoamnios
Polihidramnios
Cardiomegalia
Hepatomegalia
Esplenomegalia
Hiperecogenicidad intestinal
Ascitis
Derrame pleural

Tabla 4. Hallazgos estudiados en la ecografía fetal.

Se recogieron los resultados de la RMN fetal en aquellos casos en los que se pudo realizar.

6.6.5 Variables neonatales

Se recogió la fecha de nacimiento, la fecha de diagnóstico, el sexo, y la presencia de inmunodeficiencia en el neonato

- Variables antropométricas neonatales: Peso (g), talla (cm) y perímetro craneal (cm). Se calcularon los Z scores en relación al sexo y edad gestacional al nacimiento según las tablas de referencia de la OMS y siguiendo la siguiente fórmula: $Z \text{ score} = \frac{\text{Medida de la variable estudiada (Peso, talla o perímetro craneal)} - \text{media poblacional de esa variable en función del sexo y de la edad gestacional}}{\text{desviación estándar (SD) de la variable}}$ ²². Como el perímetro craneal está influenciado en gran medida por el peso, se calculó también el *"Perímetro craneal ajustado por el peso"*, restando al Z score del perímetro craneal, el Z score del peso al nacer. Con esto obtenemos las desviaciones estándar del perímetro craneal respecto a la media, ajustado por el peso, de tal modo que cuanto mayor sea el peso respecto al perímetro craneal, menor será el resultado. Hemos definido la microcefalia ajustada por el peso cuando el índice *"Perímetro craneal ajustado por el peso"*, es menor de -2 ²².

- Exploración física al nacimiento realizada por un pediatra: Se categorizó en normal o alterada. En el anterior apartado de las definiciones se ha incluido la de "*exploración física alterada*".
- Resultados analíticos al nacimiento: Se recogieron los resultados de la primera analítica realizada en la primera semana de vida. Si la analítica se realizó después de la primera semana, se decidió no incluir estos resultados. Se recogieron los valores de GPT (UI/L), GOT (UI/L), bilirrubina directa (mg/dL), hemoglobina (g/dL), plaquetas (cs/ μ L), leucocitos (cs/ μ L), neutrófilos (cs/ μ L).
- Citoquímica del LCR (leucocitos (cs/ μ L), proteínas (mg/dL) y hematíes (cs/ μ L)

6.6.6 Microbiología

Se recogió la fecha de realización de las pruebas microbiológicas realizadas a los recién nacidos en las dos primeras semanas de vida, así como el resultado de la PCR- CMV en distintos fluidos corporales (sangre, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo) y la carga viral cuando estaba disponible. También se registró el cultivo viral mediante la técnica de Shell Vial en orina y saliva.

En caso de que el diagnóstico se realizase de manera retrospectiva fuera de los primeros 14 días de vida, se utilizó la detección de CMV en sangre seca en las pruebas metabólicas (tarjeta de Guthrie). La sangre de las pruebas metabólicas se obtiene en las primeras 72 horas de vida y posteriormente se almacena en los

centros de referencia de cada Comunidad Autónoma, donde permanece almacenada de 1 a 5 años. Tras la obtención de un consentimiento informado de los padres, se solicitó la tarjeta almacenada. Se recortan dos de los círculos de sangre restantes y se sumergen en 500 µL de medio de transporte viral (en nuestro hospital: Copan Universal Transport Medium (UTM-RT); Copan Italia, Brescia, Italy). De ahí se obtiene la muestra que se procesará mediante PCR con las técnicas habituales en cada centro ^{93,96,126}.

6.6.7 Pruebas de imagen neonatales

En todos los niños con CMVc diagnosticado al nacimiento o en el periodo fetal, se realiza una ecografía transfontanelar al nacer. En los casos de diagnóstico retrospectivo sólo se hizo la ecografía si el tamaño de la fontanela permitía una ventana óptima para la visualización de las estructuras cerebrales. Los hallazgos en la ecografía transfontanelar que se consideraron compatibles con un CMVc fueron los recogidos en la tabla 5.

Vasculopatía lenticuloestriada *

Quistes periventriculares

Calcificaciones intracraneales

Alteraciones de la sustancia blanca

Lesiones parenquimatosas

Hidrocefalia

Ventriculomegalia

Aumento de cisterna magna
Lisencefalia y otras alteraciones de la migración
Adhesiones ventriculares
Lesiones isquémicas SNC
Hipoplasia cerebelosa

Tabla 5: Hallazgos en la ecografía transfontanelar neonatal y en la resonancia magnética nuclear craneal que se consideraron compatibles con una infección congénita por CMV. * La vasculopatía lenticuloestriada aislada no se consideró como un hallazgo patológico.

La decisión de hacer una RMN craneal dependió del médico responsable del paciente, aunque la guía clínica de referencia recomienda realizarla a todos los niños sintomáticos. Los hallazgos que se consideraron compatibles con un CMVc fueron los mismos que en el caso de la ecografía neonatal.

6.6.8 Estudios oftalmológicos

En todos los niños con citomegalovirus congénito, se efectuó por protocolo un fondo de ojo para descartar la presencia de coriorretinitis y de otras alteraciones visuales. Se recogió en el registro la presencia de coriorretinitis en el primer examen al nacer y el desarrollo posterior de coriorretinitis en el seguimiento.

6.6.9 Evaluación auditiva

Actualmente se lleva a cabo el cribado universal neonatal de la hipoacusia en todos los centros incluidos en el registro mediante los Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Cerebral Automatizados (PEATC-A). Los PEATC miden la actividad del nervio auditivo y de la vía auditiva, tras una estimulación

acústica. Se utiliza como estímulo habitualmente un "clic" que produce una activación de las neuronas de la vía auditiva, que generan un impulso eléctrico que es detectado mediante electrodos colocados en la piel de la zona mastoidea y frontal. En el cribado neonatal se usan intensidades entre 30-40 dB y el resultado es informado como *"pasa el cribado"* o *"no pasa el cribado"*.

6.6.10 Seguimiento auditivo

En los niños con CMVc se recomienda un seguimiento periódico auditivo al menos hasta la edad escolar, incluido un PEATC 1-2 veces al año.

En nuestro estudio, se determinó el grado de hipoacusia mediante PEATC al nacimiento y a los 6 y 12 meses de edad. Se definió la presencia de hipoacusia como un umbral de respuesta superior o igual a 25 dB en cualquiera de los oídos. Cuando se estudia la respuesta en los PEATC en diferentes frecuencias (500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz, 4000 Hz) se establece el umbral auditivo como una media entre los umbrales (dB) obtenidos en cada frecuencia.

Para determinar la gravedad de la hipoacusia se utilizó la clasificación más ampliamente utilizada (tabla 6) ^{115,127}.

Grado de hipoacusia (dB)
Leve (25-45 dB)
Moderada (46-70 dB)
Grave (71-90 dB)
Profunda (> 90 dB)

Tabla 6. Clasificación de la gravedad de la hipoacusia ^{115,127}.

Se estudió el grado de hipoacusia en el peor oído y en el mejor oído. Se consideró un empeoramiento de la hipoacusia en el mejor oído cuando aumentaba la categoría de la gravedad de la hipoacusia (por ejemplo, pasar de moderada a grave).

6.6.11 Tratamiento

Tratamiento durante la gestación

Se ha recogido el tratamiento con inmunoglobulina hiperinmune anti CMV (Cytotec ® CP Biotest) (HIG) durante la gestación. La utilización de la HIG como profilaxis o tratamiento de la infección fetal se ha llevado a cabo de manera rutinaria sólo en algunos pocos centros participante del registro, mientras que en la mayoría de los centros no utilizaban este tratamiento. Se recogió si se administró HIG, la fecha, la dosis y el número total de dosis y la edad gestacional en el que se administró la HIG.

Tratamiento antiviral postnatal

En el tratamiento antiviral postnatal se siguieron las recomendaciones recogidas en el documento de consenso de SEIP⁷⁹.

Ganciclovir: (Cymevene®): Se administró por vía intravenosa a dosis de 12 mg/kg/día, en dos dosis diarias.

Valganciclovir: (Valcyte®): Se administró por vía oral a dosis de 32 mg/kg/día, en dos dosis diarias.

Se indicó el tratamiento en todos aquellos niños con afectación del SNC y/o hipoacusia según las recomendaciones del documento de consenso. La utilización de tratamiento antiviral en pacientes sintomáticos sin afectación del SNC o hipoacusia se individualizó en cada caso. La duración mínima del tratamiento antiviral total fue de 6 semanas. El documento de consenso plantea la posibilidad de prolongar el tratamiento antiviral hasta los 6 meses en los niños con más síntomas.

Efectos adversos: Se recogió la presencia de efectos secundarios durante el tratamiento antiviral. En los niños que recibían el tratamiento antiviral se realizaron analíticas (hemograma y creatinina, urea y transaminasas) al menos cada 15 días para detectar la presencia de toxicidad. Se definieron como efectos adversos la presencia durante el tratamiento de los siguientes parámetros recogidos en la tabla 7.

Neutrófilos < 500/ μ L
Plaquetas < 100.000
GPT > 150 UI/L
Anemia < 9 g/dL
Afectación renal (elevación de creatinina por encima de los siguientes valores:
<7 días de vida: >2.5 (mg/dL)
7–60 días de vida: > 1.5 (mg/dL)
> 61 días >1,2 (mg/dL)
Convulsiones
Gastrointestinal (diarrea intensa o vómitos)

Tabla 7. Efectos adversos del tratamiento antiviral

6.6.12 Seguimiento a los 6 y 12 meses y valoración de la presencia de hipoacusia y de alteraciones neurológicas.

A los 6 y 12 meses de edad, se hizo una evaluación clínica . Se recogieron las siguientes variables

- Fecha de la visita
- Variables antropométricas. (Peso, talla, perímetro craneal y sus Z scores por edad y sexo)
- Hipoacusia en alguno de los oídos mediante PEATC (≥ 25 dB)

- Umbral de dB en cada oído
- Microcefalia (Sí /No)
- Alteraciones motoras: presencia de paresias o espasticidad
- Epilepsia que precise tratamiento farmacológico
- Coriorretinitis
- Retraso madurativo para su edad objetivado por un neurólogo infantil
- Exitus
- En la visita de los 12 meses, se evaluó la capacidad de sentarse sólo y mantener la sedestación sin ayuda. Se eligió este ítem por ser sencillo de evaluar, ser objetivo y estar recogido en el Test de Denver-II como un claro signo de alarma de retraso madurativo¹²⁸.
- Se consideró *afectación neurológica* a los 6 y 12 meses la presencia de alteraciones motoras (espasticidad o paresias), epilepsia que precisara tratamiento farmacológico, coriorretinitis, retraso madurativo para su edad objetivado por un neurólogo infantil, y a los 12 meses también se evaluó la incapacidad para mantener la sedestación sin ayuda.

6.7 Recogida de los datos

Los datos se recogieron directamente en la base de datos online diseñada a tal efecto. Para facilitar la recogida de datos a los investigadores, se les proporcionó una reproducción en papel de las variables de la base de datos.

6.8 Consideraciones éticas

6.8.1 Protección de datos

La base de datos se encuentra alojada en un servidor seguro del Instituto de Investigación del 12 de Octubre y el acceso está protegido por una contraseña personal. Cada investigador sólo tiene acceso a los datos de sus propios pacientes y únicamente el coordinador del registro tiene acceso a todos los datos. No se han incluido variables que permitan la identificación del paciente. Sólo se han incluido las variables indispensables para el estudio, y se han cumplido todas las recomendaciones de la declaración de Helsinki.

6.8.2 Consentimiento informado:

Se solicitó consentimiento informado a los padres de los niños con CMVc antes de incluirlos en el registro. El modelo de consentimiento informado entregado a los padres se encuentra adjunto en el anexo.

6.8.3 Comité de Ética

El registro estatal cuenta con la aprobación del Comité de Ética de referencia (Hospital 12 de Octubre) y la aprobación de los comités de ética secundarios de cada centro participante.

6.9 Estadística

6.9.1 Análisis descriptivo

Las variables cualitativas se han presentado en forma de frecuencias y porcentajes. Las variables cuantitativas se han expresado como media y su desviación estándar (SD) en el caso de variables con una distribución normal y como mediana y rango intercuartílico (RIQ) si la distribución de la variables no era normal. La comparación de las variables cualitativas se realizó mediante el test de chi-cuadrado (χ^2) o mediante el test Exacto de Fisher, cuando la frecuencia esperada es menor a 5 en alguna de las casillas de la tabla de contingencia. Como medida de efecto se calculó la Odds Ratio(OR) y su intervalo de confianza al 95% (IC95%).

En cuanto a las variables cuantitativas que se distribuían de manera normal, se utilizó la t de Student para comparar las medias de grupos independientes. Cuando las variables presentaban una distribución no normal se utilizó una prueba no paramétrica (U de Mann Whitney). En los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error tipo I menor a 0,05.

6.9.2 Análisis del tratamiento antiviral

Para estudiar qué factores condicionan la decisión del médico de iniciar un tratamiento antiviral, se realizó un análisis univariado mediante una regresión logística. Se determinó la asociación que existía entre una serie de variables que presentaban o no los niños al nacer (trombopenia, elevación de GPT > 80 UI/L,

microcefalia, ictericia, esplenomegalia, bajo peso para la edad gestacional, una PCR positiva en LCR, alteraciones en la ecografía cerebral al nacimiento o la edad gestacional al nacimiento) con la decisión del médico de iniciar o no tratamiento antiviral.

Con aquellas variables significativas ($p < 0,05$) se construyó un modelo de regresión logística múltiple. Con las probabilidades predichas por el modelo se realizó una curva ROC y se estudió el área bajo la curva (AUC) y su intervalo de confianza al 95% para conocer hasta qué punto la presencia de esas variables al nacimiento explicaban la utilización o no de tratamiento antiviral.

6.9.3 Análisis de la relación entre las variables gestacionales y la presencia de hipoacusia y alteraciones neurológicas

Para estudiar la asociación entre la administración de inmunoglobulina hiperinmune (HIG), las alteraciones en las pruebas de imagen fetal y el momento de la infección fetal (edad gestacional) con la presencia de secuelas a los 6 y 12 meses de edad, se hizo en primer lugar un análisis univariado con estas variables. Para conocer el papel modificador que el momento de la infección fetal supone sobre la variable "resultado de la ecografía fetal" se utilizó un modelo de regresión logística en el que se incluyen ambas variables y se calcula su asociación con la presencia de secuelas a los 6 y 12 meses, expresándola en forma de OR ajustada, su intervalo de confianza y el valor "p".

6.9.4 Análisis de la relación entre las variables neonatales y la presencia de hipoacusia y alteraciones neurológicas

Para conocer el papel predictor de secuelas que algunas características del niño podían tener, se efectuó inicialmente un análisis univariado del riesgo mediante una regresión logística. Se incluyeron en este análisis univariado aquellas variables que tras una revisión teórica pudieran tener un papel pronóstico en el CMVc, y de las que disponíamos datos en un número importante de sujetos (tabla 8). Se decidió dejar fuera del modelo y analizar a parte el resultado en la PCR en el LCR, debido al número limitado de niños en los que se practicó dicha prueba.

Plaquetas < 1000000 plaq./ μ L(Sí/No)
Neutrófilos < 500 cs' (μ L Sí/No)
GPT > 80 UI/L (Si/No)
Microcefalia (Sí/No)
Microcefalia ajustada por el peso al nacer (Sí/No)
Esplenomegalia (Sí/No)
Ictericia (Sí/No)
Bajo peso para la edad gestacional (< -2 Z score) (Sí/No)
Alteraciones en ecografía cerebral al nacimiento (Sí/No)
Edad gestacional al nacimiento (semanas cumplidas)
Hipoacusia en algún oído (dB >25) (Sí/No)

Tabla 8. Variables que se incluyeron en el análisis univariado de los factores pronósticos de secuelas neurosensoriales

Todas las variables se incluyeron en forma de variables dicotómicas, según las definiciones anteriormente recogidas. En cuanto a la trombopenia se utilizó el valor de corte de 100.000 plaquetas/ μ L como en la mayor parte de los estudios publicados^{32,64,77,115}. También se usó el valor de corte previamente publicado para la elevación de la GPT de 80UI/^{77,115}. Se consideró neutropenia grave una cifra de neutrófilos <500 cs/ μ L .

Para poder conocer con exactitud la asociación que tiene cada variable de con el desarrollo de secuelas, se desarrolló un modelo de regresión logística múltiple a

partir de las variables estudiadas. Se decidió incluir en el modelo aquellas variables que resultaron significativas ($p < 0,05$) en el análisis univariado, estudiando por separado su asociación con el desarrollo de hipoacusia y de alteraciones neurológicas a los 6 y 12 meses de edad.

6.9.5 Construcción de un modelo predictivo de desarrollo de hipoacusia y de alteraciones neurológicas

Uno de los objetivos principales del estudio es elaborar un modelo predictivo del riesgo de desarrollo de hipoacusia y de alteraciones neurológicas en el primer año de vida. Para ello, en primer lugar realizamos mediante una regresión logística un análisis univariado de la asociación de las variables pronósticas con el desarrollo de secuelas en el primer año de vida. Se decide incorporar sin categorizar las variables continuas (número de plaquetas y valor de la GPT (UI/L)) para intentar obtener un modelo predictivo lo más exacto posible. Se estudiaron todas las variables incluidas en la tabla 9:

Plaquetas /10.000 (cs/ μ L)
GPT (UI/L)
Microcefalia (Sí/No)
Esplenomegalia (Sí/No)
Ictericia (Sí/No)
Pequeño para la edad gestacional (< -2 Z score) (Sí/No)
Alteraciones en ecografía cerebral al nacimiento (Sí/No)
Edad gestacional al nacimiento (Sí/No)
Hipoacusia en algún oído (dB >25) (Sí/No)

Tabla 9. Variables estudiadas para elaborar un modelo predictivo de hipoacusia y alteraciones neurológicas

Para determinar el mejor modelo posible, se seleccionaron como potenciales variables predictivas aquellas que en el análisis univariado tenían una $p < 0,02$. Mediante el script AllSetsReg para SPSS elaborado por el Laboratori d' Estadística Aplicada de la Universidad Autònoma de Barcelona¹²⁹ se estudian los submodelos posibles, tanto para el desarrollo de hipoacusia, como para las alteraciones neurológicas, y se eligen los mejores modelos predictivos según el menor valor obtenido en el criterio "Cp de Mallows", que ha sido adaptado por Hosmer y Lemeshow para un modelo de regresión logística^{129,130}.

La ecuación del modelo estimado que predice el valor del logaritmo de la odds de niños con hipoacusia o con alteraciones neurológicas se elaborará con los coeficientes β recogidos en la tabla de resultados.

Ejemplo:

$\ln \text{Odds de hipoacusia} = \text{constante} + \beta_1 \times \text{valor de variable 1 para ese sujeto} + \beta_2 \times \text{valor de variable 2 para ese sujeto} = y$

$\text{Odds de hipoacusia} = e^y$

$\text{Riesgo de hipoacusia} = 1 / (1 + e^{-(y)})$

El coeficiente β de una variable predictora valora el efecto sobre el riesgo de presentar el evento en la variable dependiente (en este caso, de hipoacusia o alteraciones neurológicas). Un coeficiente β con signo positivo indica una mayor frecuencia del evento de la variable dependiente cuando la variable independiente aumenta de valor y un coeficiente β con signo negativo una menor frecuencia del evento cuando la variable independiente aumenta de valor.

Finalmente, para poder conocer de forma rápida el riesgo que tiene un paciente con unas características propias de presentar secuelas (hipoacusia o alteraciones

neurológicas) hemos incluido una serie de pacientes teóricos en los modelos y hemos calculado el riesgo para los distintos valores posibles. Se ha recogido este riesgo de presentar el evento en función de unos valores concretos en dos tablas, para que pueda ser consultado de manera sencilla.

6.9.6 Análisis de la relación entre el resultado de la PCR en el líquido cefalorraquídeo y el desarrollo de hipoacusia y alteraciones neurológicas

La determinación de la PCR de CMV en el líquido cefalorraquídeo no se realiza de manera rutinaria en todos los hospitales. En algunos centros se practica una punción lumbar a todos los niños con infección congénita confirmada, pero en otros hospitales sólo se hace en los casos sintomáticos. Aunque algunos estudios parecen relacionar un resultado positivo de la PCR con un peor pronóstico, estos trabajos incluyen un escaso número de pacientes y las conclusiones no pueden generalizarse^{77,131,132}. Dado que esta prueba no se ha llevado a cabo en todos los centros de manera rutinaria (en algunos se ha hecho sólo a los niños sintomáticos) y dado que el número de niños con PL realizada que han completado los seguimientos es limitado, se decide analizar esta variable de manera independiente. Sólo se incluyó a aquellos pacientes en los que la PL se efectuó en el periodo neonatal. Los niños en los que la punción lumbar se realizó fuera del periodo neonatal o en los que se desconocía el momento de ejecución de la prueba fueron excluidos de este análisis. Para

conocer el papel propio de la presencia de una PCR positiva en el LCR en el desarrollo de secuelas neurosensoriales, y evaluar el posible sesgo de selección de niños sintomáticos, se recurrió a un análisis estratificado por la presencia o no de lesiones en la ecografía fetal al nacer, mediante el test exacto de Fisher. Como medida del efecto, se calculó la OR junto a su intervalo de confianza (IC) al 95%, estratificado por la presencia de alteraciones ecográficas al nacimiento.

6.9.7 Análisis de la relación entre la presencia de vasculopatía lenticuloestriada (VLE) y el desarrollo de hipoacusia y alteraciones neurológicas

La presencia de una vasculopatía lenticuloestriada en la ecografía neonatal se ha relacionado a un mayor riesgo de secuelas en algunos estudios^{78,133,134}. Para conocer el papel que la vasculopatía lenticuloestriada puede tener en el desarrollo de secuelas, se realiza un análisis mediante el test exacto de Fisher estratificado en función de la presencia de otras alteraciones en la ecografía neonatal. También se estudió el papel de la VLE en los niños asintomáticos, estratificando el análisis en función de si han recibido o no tratamiento antiviral. Como medida del efecto, se calculó la Odds Ratio (OR) junto a su intervalo de confianza (IC) al 95% .

7. RESULTADOS

7 RESULTADOS

7.1 Análisis descriptivo de la población de estudio

7.1.1 Reclutamiento

Desde comienzo del registro en 2011, se han incluido 297 niños con infección congénita confirmada por CMV. El número de pacientes registrados por cada hospital se encuentra recogido en la tabla 10

Hospital	Número de pacientes incluidos (%)
Hospital 12 de Octubre	28 (9,4)
Hospital Arnau de Vilanova	7 (2,4)
Hospital Clínico San Carlos	9 (3)
Hospital de la Axarquía	2 (0,7)
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau	9 (3)
Hospital Málaga	7 (2,4)
Hospital Dexeus Barcelona	6 (2)
Hospital Donostia	7 (2,4)
Hospital Fuenlabrada	2 (0,7)
Hospital General de Catalunya	6 (2)
Hospital de Getafe	7 (2,4)
Hospital Gregorio Marañón	20 (6,7)
Hospital Infanta Cristina. Badajoz	2 (0,7)
Hospital Infanta Leonor	1 (0,3)
Hospital Infanta Sofía, Madrid	10 (3,4)
Hospital Joan XIII	2 (0,7)
Hospital La Paz	63 (21,2)

Hospital Las Palmas de Gran Canaria	7 (2,4)
Hospital de Mataró. Consorci Sanitari del	4 (1,3)
Maresme	
Hospital Moncloa	1 (0,3)
Hospital de Navarra	12 (4)
Hospital de Pontevedra	4 (1,3)
Hospital Príncipe de Asturias	2 (0,7)
Hospital Puerta de Hierro	7 (2,4)
Hospital Puerta del Mar	7 (2,4)
Hospital Quirón (Barcelona)	7 (2,4)
Hospital San Joan de Deu	23 (7,7)
Hospital Severo Ochoa	3 (1)
Hospital Son Llatzer	2 (0,7)
Hospital del Sureste (Arganda)	1 (0,3)
Hospital de Torreldones	2 (0,7)
Hospital Universitario de Canarias	2 (0,7)
Hospital Vall d'Hebron	24 (8,1)
Hospital Virgen Macarena de Sevilla	1 (0,3)

Tabla 10. Número de pacientes y porcentaje respecto al total, incluidos en el registro por cada centro.

7.1.2 Características maternas

El 82,8% (n=246) de las madres de los niños infectados eran de origen español, con una distribución heterogénea del resto de nacionalidades. Tras la española, las madres de origen marroquí (n=8; 2,7%) y las de origen rumano (n=6; 2%) fueron las nacionalidades más frecuentes (tabla 11).

Nacionalidad materna	n	%
Mali	1	0,3
Marruecos	8	2,7
Nigeria	2	0,7
Paquistán	1	0,3
Paraguay	1	0,3
Perú	1	1,3
Filipinas	1	0,3
Rumania	6	2,0
Senegal	1	0,3
España	246	82,8
Bolivia	2	0,7
China	1	0,3
Colombia	1	0,3
Cuba	1	0,3
Republica Dominicana	3	1
Ecuador	3	1
Guinea Ecuatorial	1	0,3
Francia	1	0,3
Argentina	2	0,7
Desconocida	11	3,7
TOTAL	297	100

Tabla 11. Nacionalidades de las madres de los niños diagnosticados de CMVc incluidos en el registro estatal.

El 30,4% (n=69) de las madres tenían otro hijo menor de 3 años en el momento del parto y un 26,6% algún hijo que acudía a la guardería. Sólo el 8% de las madres referían tener contacto en el trabajo con niños y el 3,2% un contacto

durante la gestación con una persona con una infección aguda por CMV. El 4,8% (n=14) de las embarazadas presentaban algún tipo de inmunodeficiencia primaria o secundaria (12 madres presentaban una infección por el VIH). La tasa de transmisión vertical del VIH en esta cohorte de niños con CMVc es del 16,7% (n=2/12) (tabla 12). No se disponen de datos sobre el tratamiento materno del VIH durante la gestación, ni de su situación inmunoviológica.

Características de las madres durante la gestación	n	Media (SD) o %
Edad (años)	250	31,2 (5,9)
Número de embarazos previos	271	1,3 (1,2)
Número de abortos previos	267	0,4 (0,7)
Hijo menor de 3 años	69/227	30,4%
Trabajo con niños menores de 3 años	17/213	8%
Acude algún hijo a guardería	67/252	26,6%
Contacto conocido con CMV	7/219	3,2%
Inmunodeficiencia	14/289	4,8%
VIH	12/289	4,1%
Trasplante de órgano sólido o TPH	0/298	0%
Otras situaciones inmunodepresoras	2/298	6,9%
Infección sintomática materna	60/271	22,1%
Síndrome monucleósico (faringitis, fiebre y astenia)	34/271	12,5%
Fiebre (>38°C)	9/271	3,3%
Elevación de transaminasas	8/271	3%
Linfadenitis	3/271	1,1%
Otros síntomas	7/271	2,6%
Embarazo gemelar	28/267	9,5%

Infección materna primaria confirmada durante la gestación	95/132	72%
Edad gestacional en infección materna (semanas)	67	23,6 (9,5)
Serologías maternas		
IgM 1T	18/42	42,9%
IgG 1T	21/46	45,7%
IgM 2T	36/55	65,5%
IgG 2T	45/57	78,9%
IgM 3T	46/81	56,8%
IgG 3T	77/85	90,6%
Avidez baja	30/51	58,8%
Avidez media	5/51	9,8%
Avidez alta	16/51	31,4%
PCR en amniocentesis positiva	32/49	65,3%
Edad gestacional en primera amniocentesis	45	25,3 (5,3)
Carga viral en amniocentesis (copias/mL)	12	472903 (866548)
PCR en cordocentesis positiva	3/5	60%
Edad gestacional en primera amniocentesis	6	27,7 (5,0)
Carga viral en amniocentesis (copias/mL)	3	16623,3 (19141,3)
PCR en amniocentesis positiva	32/49	65,3
Inmunoglobulina hipereinmune anti CMV	25/297	8,4%

Tabla 12. Características de las madres durante la gestación. TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos. 1T: primer trimestre. 2T: segundo trimestre. 3T: tercer trimestre. Las variables dicotómicas se expresan como número de gestantes con esa variable, sobre el total y el porcentaje que supone. Las variables cuantitativas se han expresado como media y SD (Desviación estándar).

Un 22,1% (n=60) de las gestantes habían presentado algún síntoma compatible con una infección por CMV, siendo el síndrome mononucleósico la

manifestación más frecuente (12,5%) (tabla 12). Nacieron 28 niños fruto de 14 embarazos gemelares. Entre las 132 gestaciones en las que disponemos de serologías maternas, se produjo una primoinfección (seroconversión o presencia de IgM positiva con IgG de baja avidéz) en 95 casos (72,0%). En el resto de los casos se desconocían las serologías o no se pudo confirmar la primoinfección durante el embarazo. Se realizó una amniocentesis en 49 gestaciones (16,5%) y en un caso se efectuaron dos amniocentesis ante un primer resultado negativo. La amniocentesis fue negativa en el 34,7% (n=17) de los casos. Entre las 34 amniocentesis en las que se conoce el momento de la infección materna, en 21 embarazos (61.8%) se realizó antes de que hubiesen transcurrido 6 semanas desde la infección. Todas las amniocentesis (4/4; 100%) practicadas antes de las 20 semanas de edad gestacional resultaron negativas, frente a un 29,2% (12/41) de las que se hicieron a partir de la semana 20 de gestación. Realizar la amniocentesis antes de la semana 20 se asoció con un mayor riesgo de obtener un resultado falso negativo de la PCR en líquido amniótico ($p=0,012$; $OR=1,3$ ($IC_{95\%}: 1,01-1,77$)). Se hizo una cordocentesis en 6 casos, en dos de los cuales la PCR fue negativa.

7.1.3 Características del niño

El diagnóstico de la infección congénita se efectuó en el periodo fetal en un 10% de los casos, en los primeros 14 días de vida en un 73,6% y en un 17,3% el diagnóstico se hizo de manera retrospectiva mediante la PCR en sangre seca

del talón (tabla 13). La exploración física estaba alterada en el 36,7% de los casos, siendo las petequias y el bajo peso para la edad gestacional los hallazgos más frecuentes. Se consideraron sintomáticos al nacer el 47,9% de los casos (tabla 14). El 31,2% de los niños no pasó el cribado auditivo y se confirmó la hipoacusia (≥ 25 dB) en al menos un oído en el 36,5% de los recién nacidos. Un 56,8% (25/44) de los casos en los que el diagnóstico se realizó de forma tardía fuera del periodo neonatal (diagnóstico retrospectivo) no habían pasado el cribado auditivo al nacer. El resto de características del recién nacido se encuentran recogidas en la tabla 14.

	n	Media (SD) o %
Edad gestacional al nacimiento (semanas)	271	37,2 (3,2)
Diagnóstico de la infección congénita	277	
Fetal	28	10,1%
Neonato (≤ 14 días de vida)	201	72,6%
Retrospectivo (>14 días de vida)	48	17,3%
Niños con síntomas al nacimiento y diagnóstico retrospectivo	30/48	62,5%
Edad al diagnóstico (días)	295	34,3 (84,3)
Edad al diagnóstico en casos retrospectivos (días)	48	168,7 (147,5)
Sexo femenino	140/273	51,3%
Inmunodeficiencia		
VIH (porcentaje de transmisión vertical)	2/12	16,7%
Otras	3/289	1%
Antropometría al nacimiento		
Peso (gr)	276	2573,8 (731,8)

Z score peso	235	-0,8 (1,0)
Talla (cm)	261	46,3
Z score talla	227	-0,6 (0,9)
Perímetro cefálico (cm)	258	32,5 (3,1)
Z score perímetro craneal	226	-0,4 (1,2)
Z score perímetro craneal ajustado por el peso*	226	0,4(1,0)

Tabla 13. Características epidemiológicas y antropométricas del recién nacido. El Z score de perímetro craneal (PC) ajustado por el peso se obtiene al restar al Z score del PC el Z score del peso ²².

El 30,6% tenían alguna alteración analítica, siendo la trombopenia (<100.000 plaquetas/ μ L) el hallazgo más frecuente (tabla 14).

	n	Media (SD) o %
Recién nacido sintomático	147/282	47,9%
Exploración física al nacer		
Normal	171	63,3%
Alterada	99	36,7%
Síntomas en exploración física		
Petequias / púrpura	40/270	14,8%
Bajo peso para la edad gestacional	32/270	11,9%
Hepatomegalia	24/270	8,9%
Esplenomegalia	23/270	8,5%
Microcefalia	21/270	7,8%
Ictericia	16/270	5,9%
Hipotonía	13/270	4,8%

Convulsiones	1/270	0,04%
Otros	24/270	8,9%
Coriorretinitis	11/261	4,2%
Cribado auditivo		
Pasa el cribado	176/256	68,8%
No pasa el cribado	80/256	31,2%
No hipoacusia al nacer (<25 dB)	148/233	63,5%
Hipoacusia en algún oído al nacer	85/233	36,5%
Hipoacusia leve (25-45 dB)	13/233	5,6%
Hipoacusia moderada (46-70 dB)	28/233	12,0%
Hipoacusia severa (71-90 dB)	17/233	7,3%
Hipoacusia profunda (> 90 dB)	26/233	11,6%
dB oído derecho al nacer	207	35,3 (25,5)
dB oído izquierdo al nacer	209	37,3 (40,1)
Hipoacusia en el mejor oído al nacer (>25 dB)	63/204	30,9%
Leve (26-45 dB)	31/204	15,2%
Moderada (46-70 dB)	15/204	7,4%
Grave (71-90 dB)	11/204	5,4%
Profunda (> 90 dB)	6/204	2,9%
dB en el mejor oído al nacer	204	30,8(21,2)
Alteraciones analíticas al nacer	69/224	30,8%
GPT > 80 UI/L	13/184	7,1%
Neutrófilos < 500 cs/ μ L	3/197	1,5%
Plaquetas < 100.000/ μ L	42/208	20,2%
Hemoglobina < 9,5 g/dL	21/150	14%

Tabla 14. Características clínicas y analíticas al nacer de los niños con una infección congénita por CMV. dB: decibelios. Se definió hipoacusia como la presencia de un umbral auditivo superior o igual a 25 dB en algún oído.

7.1.4 Estudios microbiológicos

Para confirmar la infección congénita por CMV se llevaron a cabo una serie de estudios microbiológicos (tabla 15). La presencia de una IgM positiva frente a CMV sólo se detectó en el 31,6% de los casos estudiados (tabla 15). El cultivo viral mediante la técnica de Shell Vial fue positivo en el 91%, presentando una mejor sensibilidad la PCR en orina (97,1%). Un 15% de los recién nacidos con una infección congénita por CMV van a presentar una PCR negativa en sangre. Se dispuso de la carga viral al nacimiento en 118 niños. En la figura 8, se recoge el resultado de la carga viral en sangre en función del momento en el que se realiza dicha prueba, sin encontrarse una asociación significativa entre ambas variables ($p=0,3$).

La sensibilidad de la sangre seca de talón en aquellos casos en los que el diagnóstico se hizo en el periodo neonatal fue de un 100% (5/5). En la tabla 15, se han recogido los principales resultados microbiológicos de los recién nacidos estudiados.

Prueba diagnóstica	n	Media (SD) o %
IgM positiva	42/133	31,6%
Shell vial de orina positivo	101/111	91,0%
Cultivo viral de saliva positivo	5/6	83,3%
PCR en orina positiva	133/147	97,1%
PCR en sangre positiva	140/165	84,8%
PCR en LCR	24/142	16,9%
PCR en sangre seca del talón	39/41	95,1%
PCR saliva positiva	6/6	100%
PCR en sangre de cordón	9/10	90%
Carga viral en orina (copias/mL)	68	41255233,2 (173460866)
Carga viral en sangre (copias/mL)	118	90253,3 (686025)

Tabla 15. Estudios microbiológicos en el recién nacido. En el caso de la sangre seca de talón utilizada para el diagnóstico retrospectivo, las muestras fueron obtenidas en la primera semana de vida. LCR: líquido cefalorraquídeo.

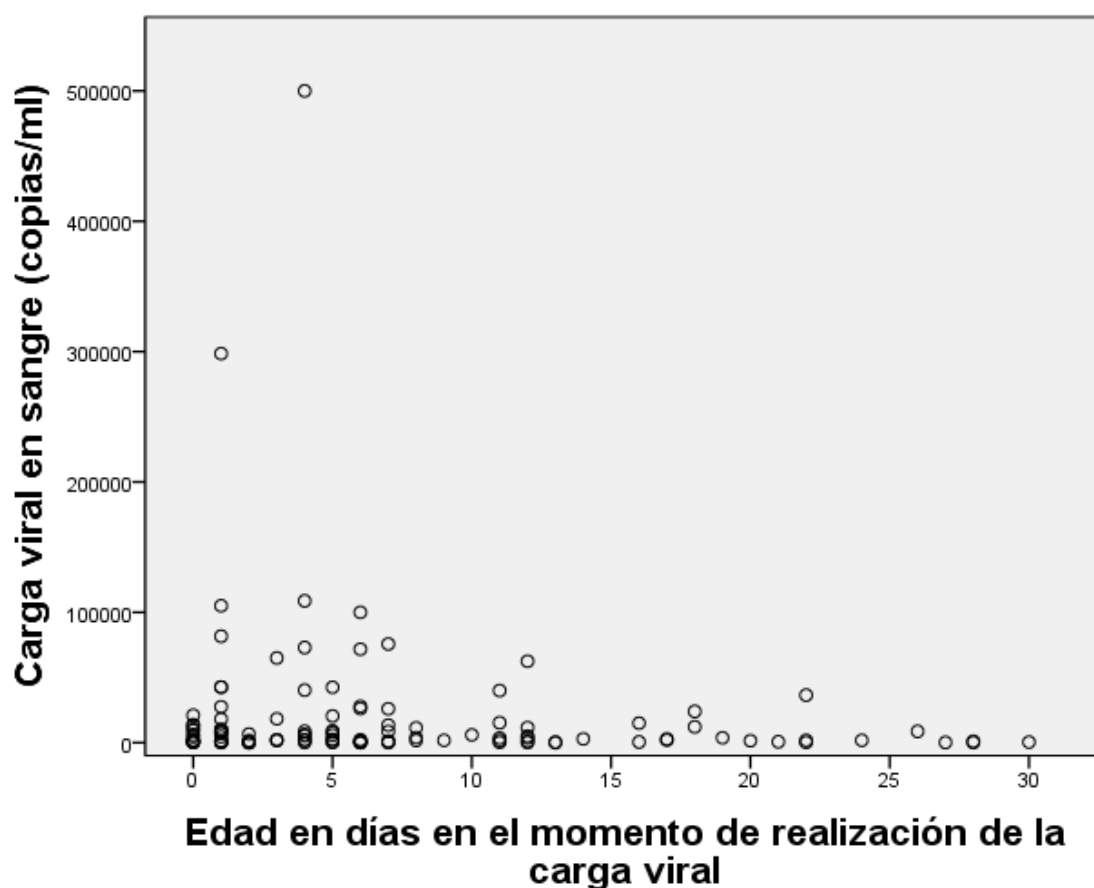


Figura 8. Carga viral en sangre (copias/mL) en función de la edad del niño(días) en el momento de la realización de la prueba.

7.1.5 Hallazgos en las pruebas de imagen neonatales

Se encontraron alteraciones en la ecografía transfontanelar neonatal en un 40,8% (104/255) de los niños (tabla 16). El hallazgo más frecuente es la presencia de una vasculopatía lenticuloestriada (20%), seguida de los quistes periventriculares (13,3%) y las calcificaciones intracraneales (12,9%) (tabla 16). La presencia de VLE de manera aislada sin otros hallazgos ecográficos no se consideró patológica.

Se realizaron 140 resonancias magnéticas craneales al nacimiento y se encontraron alteraciones en un 67,1% de los casos (tabla 17). El hallazgo más frecuente en la RMN fue la alteración de la sustancia blanca, que se presentaba en un 22,9% de los casos, seguida de los quistes periventriculares (17,9%) y de las calcificaciones intracraneales (15,7%) (tabla 17).

	n	%
Normal	151	59,2
Alterada	104	40,8
Vasculopatía lenticuloestriada *	52	20,4
Quistes periventriculares	34	13,3
Calcificaciones intracraneales	33	12,9
Alteraciones de la sustancia blanca	22	8,6
Lesiones parenquimatosas	11	1,2
Hidrocefalia	10	3,9
Ventriculomegalia	9	3,5
Aumento de cisterna magna	6	2,4
Lisencefalia y otras alteraciones de la migración	3	1,2
Adhesiones ventriculares	3	1,2
Lesiones isquémicas SNC	3	1,2
Hipoplasia cerebelosa	1	0,4
Otras	16	6,3

Tabla 16. Hallazgos característicos de la infección congénita por CMV en la ecografía transfontanelar neonatal. *La presencia de una vasculopatía lenticuloestriada aislada no se consideró una alteración ecográfica.

	n	%
Normal	46	32,9
Alterada	94	67,1
Alteraciones de la sustancia blanca	68	22,9
Quistes periventriculares	25	17,9
Calcificaciones intracraneales	22	15,7
Lesiones parenquimatosas	13	9,3
Hidrocefalia	13	4,4
Ventriculomegalia	11	3,7
Aumento de cisterna magna	11	7,9
Lisencefalia y otras alteraciones de la migración	11	7,9
Hipoplasia cerebelosa	9	6,4
Vasculopatía lenticuloestriada *	5	3,6
Lesiones isquémicas SNC	2	1,4
Adhesiones ventriculares	2	1,4
Otras	10	7,1

Tabla 17. Hallazgos característicos de la infección congénita por CMV en la resonancia magnética craneal neonatal. *La presencia de una vasculopatía lenticuloestriada aislada no se consideró una alteración ecográfica.

En 126 niños, se dispuso de los resultados tanto de la ecografía como de la RMN al nacimiento (figura 9). Entre los que tenían una ecografía normal, un 35% (21/30) presentaban alteraciones en la resonancia (figura 9). El hallazgo que mayoritariamente presentaban estos pacientes era la alteración de la sustancia blanca (67%; 14/21). El 67% (14/21) de estos niños presentaban una exploración

física normal y el 63% hipoacusia al nacer. A los 12 meses de edad el 75% presentaba hipoacusia y un 25% alteraciones neurológicas. Tres niños (3/21) presentaron un empeoramiento auditivo durante el seguimiento, a pesar de recibir tratamiento antiviral.

Entre los 66 niños con una ecografía alterada, hubo 7 niños (10,6%) en los que la resonancia fue informada como normal (figura 9). Cinco de estos 7 niños mostraban en la ecografía calcificaciones intracraneales, que no se observaron en la RMN neonatal.

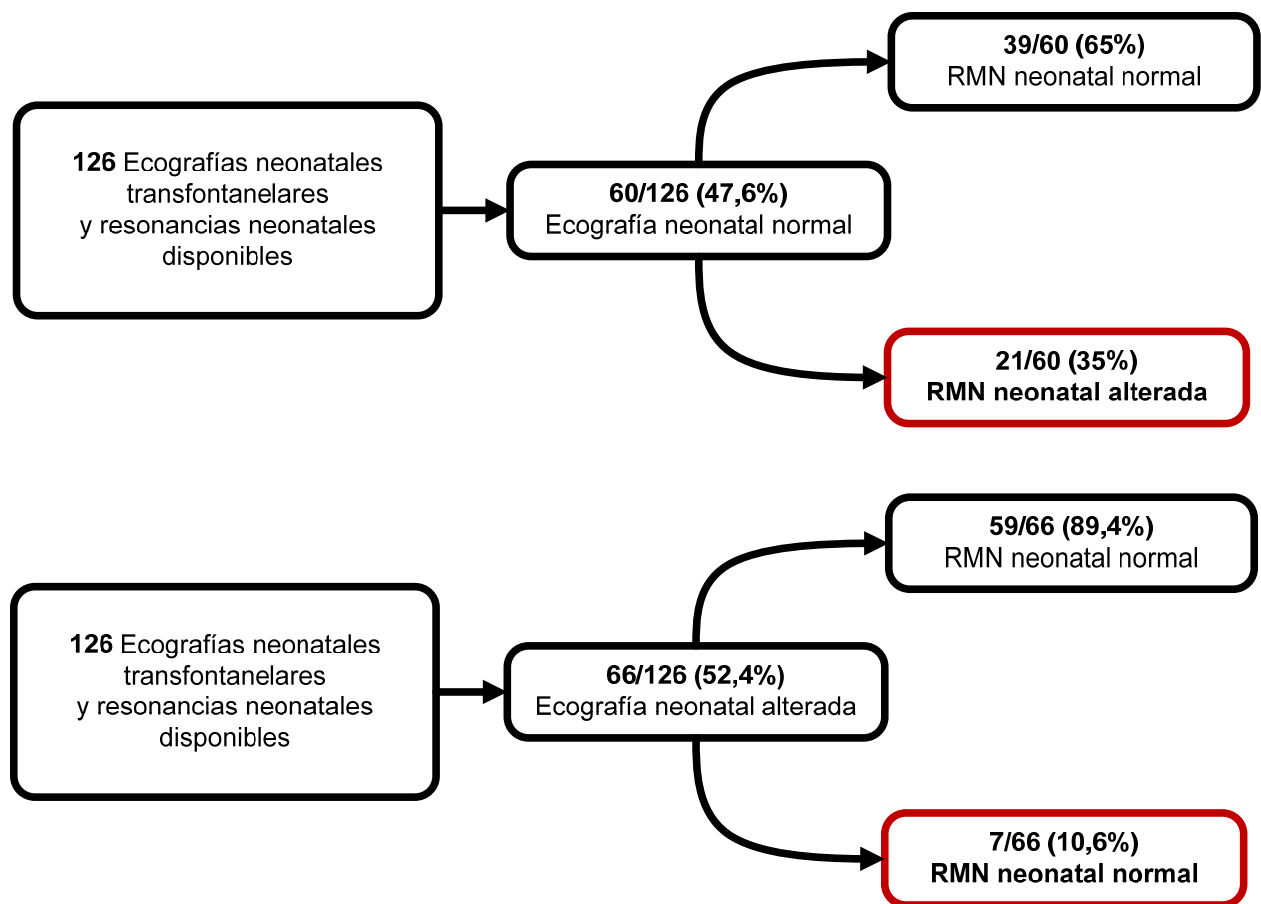


Figura 9. Resultado de la resonancia magnética nuclear neonatal en función de los resultados de la ecografía transfontanelar neonatal. RMN: resonancia magnética nuclear

7.1.6 Tratamiento antiviral

Se dispone de información sobre el tratamiento antiviral en el 90,2% de los niños. Los distintos tratamientos antivirales y la duración media de los mismos han sido recogidos en la siguiente tabla 18.

	n	Media (SD) o %
Tipo de tratamiento antiviral		
Ninguno	77	28,7%
Ganciclovir i.v	15	5,6%
Valganciclovir v.o	75	28,0%
Ganciclovir i.v y valganciclovir v.o	101	37,7%
Duración del tratamiento antiviral		
Ganciclovir i.v (días)		12,7 (15,1)
Valganciclovir i.v (días)		84,5 (84,7)
Tiempo total de tratamiento antiviral (días)		85,7 (88,5)
Efectos adversos del tratamiento antiviral		
Durante el tratamiento con ganciclovir i.v	21/113	18,6%
Neutrófilos < 500 / μ L	13/113	11,5%
Plaquetas < 100. 000/ μ L	8/113	7%
GPT > 150 UI/L	1/113	0,9%
Anemia < 9 g/dL	2/113	1,8%
Afectación renal	0/113	0%
Convulsiones	0/113	0%
Gastrointestinal	0/113	0%
Otros	5/113	4,4%
Durante el tratamiento con valganciclovir v.o	36/125	22,4%
Neutrófilos < 500 / μ L	23/125	18,5%
Plaquetas < 100.000/ μ L	2/125	1,6%
GPT > 150 UI/L	1/125	0,8%
Anemia < 9 g/dL	4/125	3,2%
Afectación renal	0/125	0%
Convulsiones	0/125	0%
Gastrointestinal	0/125	0%
Otros	5/125	4%

Tabla 18. Tratamiento antiviral recibido tras el nacimiento, duración del mismo y efectos adversos principales.

Durante el tratamiento con ganciclovir y valganciclovir un 11,5% y un 22,4% respectivamente, presentaron neutropenia grave (<500 neutrófilos/ μL). El riesgo de padecer neutropenia fue mayor en aquellos pacientes que reciben tratamiento antiviral prolongado (> 6 semanas), OR: 2,8 (IC95%: 1,3-6,5); $p=0,01$, y la duración media del tratamiento antiviral entre los que presentan y no presentan neutropenia también es diferente (123,1 días (SD=98,2) frente a 80,3 días (SD=86); $p= 0,027$) (figura 10). No se encontraron diferencias significativas en el riesgo de presentar neutropenia entre aquellos niños que recibían ganciclovir en el tratamiento (aislado o en tratamiento secuencial con valganciclovir oral) y los niños que sólo recibieron valganciclovir oral ($p=0,8$).

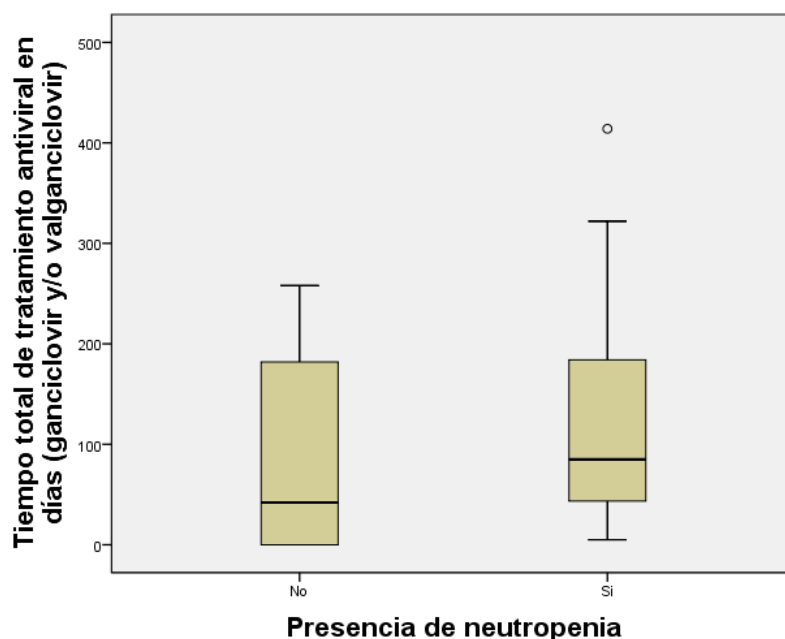


Figura 10. Tiempo de tratamiento antiviral total (ganciclovir y/o valganciclovir) en días, en función de la presencia o no de neutropenia ($p=0,027$).

Dos niños presentaron anemia (< 9 g/dL) con el tratamiento con ganciclovir y cuatro durante el tratamiento con valganciclovir. De estos últimos, dos niños presentaron una anemia grave, con hemoglobinas de 5,5 g/dL y de 6,2 g/dL en las primeras 10 semanas de vida y que precisaron una transfusión. Aquellos pacientes que presentaban hipoacusia o alteraciones neurológicas a los 12 meses de edad recibían un tratamiento antiviral más prolongado ($p=0,013$ y $p=0,0001$ respectivamente) (figuras 11 y 12).

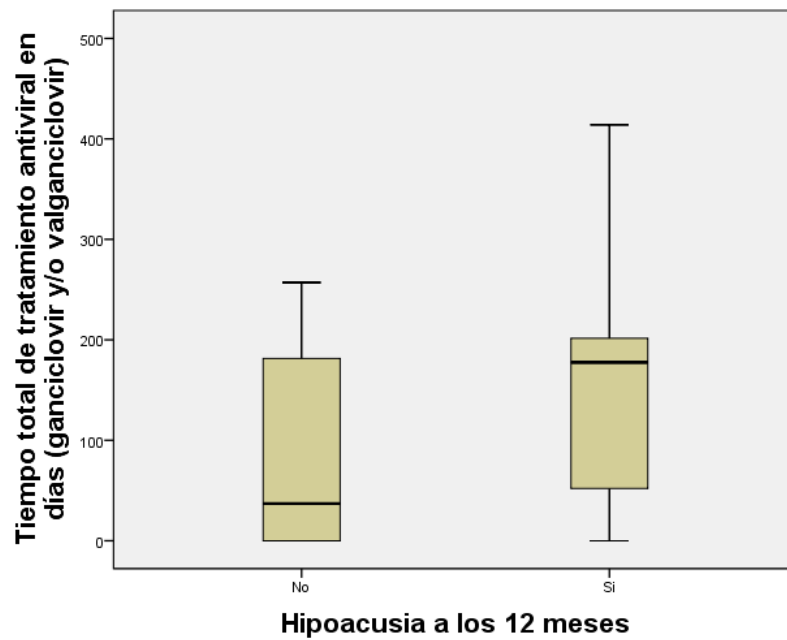


Figura 11. Tiempo de tratamiento antiviral total (ganciclovir y/o valganciclovir) en días en función de la presencia o no de hipoacusia a los 12 meses de vida ($p=0,013$).

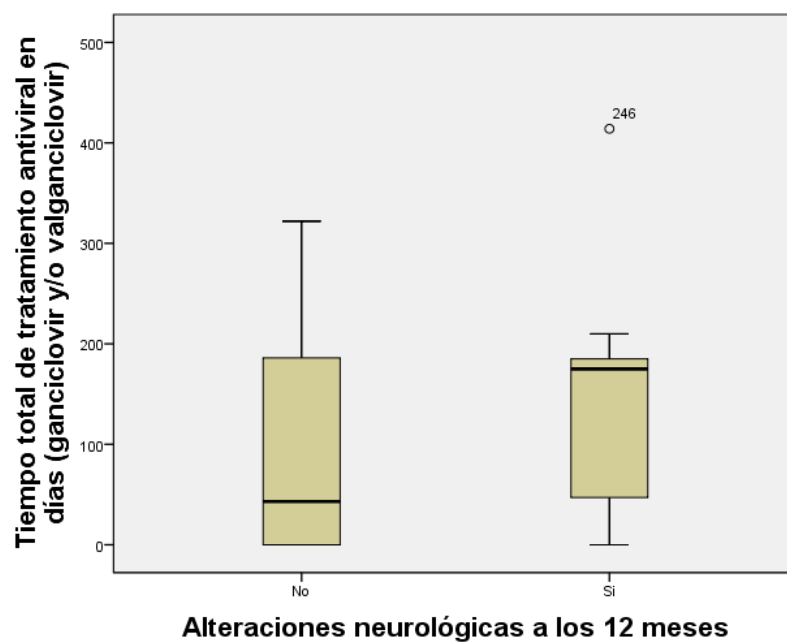


Figura 12. Tiempo de tratamiento antiviral total (ganciclovir y/o valganciclovir) en días en función de la presencia o no de alteraciones neurológicas a los 12 meses de vida ($p=0,0001$).

Para conocer los factores que condicionan la decisión del médico de iniciar tratamiento antiviral, se estudió su asociación con distintas variables al nacimiento: trombopenia, elevación de GPT >80 UI/L, microcefalia, ictericia, esplenomegalia, bajo peso para la edad gestacional, una PCR positiva en LCR, alteraciones en la ecografía cerebral al nacimiento o la edad gestacional al nacimiento. En el estudio univariado la presencia de una GPT elevada, la microcefalia, esplenomegalia, ictericia, una PCR positiva en LCR y las alteraciones ecográficas se asociaban a una mayor probabilidad de recibir tratamiento antiviral (tabla 19).

	Tratamiento antiviral	
	OR (IC95%)	p
Plaquetas < 100.000 cs / μ L	2,3 (0,9-5,8)	0,076
Neutrofilos < 500 cs/mm ³	0,17 (0,02-1,9)	0,17
GPT > 80 UI/L	1,1 (1,05-1,2)	0,04
Microcefalia	8,5(1,1-64,3)	0,014
Esplenomegalia	10 (1,3-75,2)	0,006
Ictericia	1,1 (1,05-1,14)	0,008
Bajo peso para la edad gestacional (<-2 Z score)	2,3 (0,8-6,2)	0,097
PCR positiva en LCR	11,1 (1,4-83,8)	0,005
Alteraciones en la ecografía cerebral neonato	8,4 (3,5-20,4)	0,0001
Edad gestacional al nacimiento	0,99 (0,9-1,08)	0,8

Tabla 19. Análisis univariado de la asociación entre las distintas variables neonatales y la decisión del médico de iniciar tratamiento antiviral.

Se elaboró un modelo explicativo del tratamiento antiviral mediante una regresión logística múltiple, en la que se incluyeron todas las variables significativas del análisis univariado (GPT elevada, la microcefalia, la presencia de esplenomegalia, de ictericia, la PCR positiva en LCR y las alteraciones ecográficas). Al realizar la curva ROC (figura 20), el área bajo la curva (AUC) de las probabilidades predichas por este modelo es de 0,81 (0,74-0,89). Este valor del AUC indica que la decisión de si un paciente va a recibir tratamiento antiviral tras el nacimiento viene condicionada en gran parte por la presencia al nacer de las variables incluidas en el modelo. En resumen, cuanto mayor es el número de estos síntomas al nacer, mayor es la probabilidad de que el médico inicie el tratamiento antiviral y la duración del tratamiento es mayor cuanto mayor es la gravedad del niño (por ejemplo si desarrolla hipoacusia o alteraciones neurológicas durante el seguimiento).

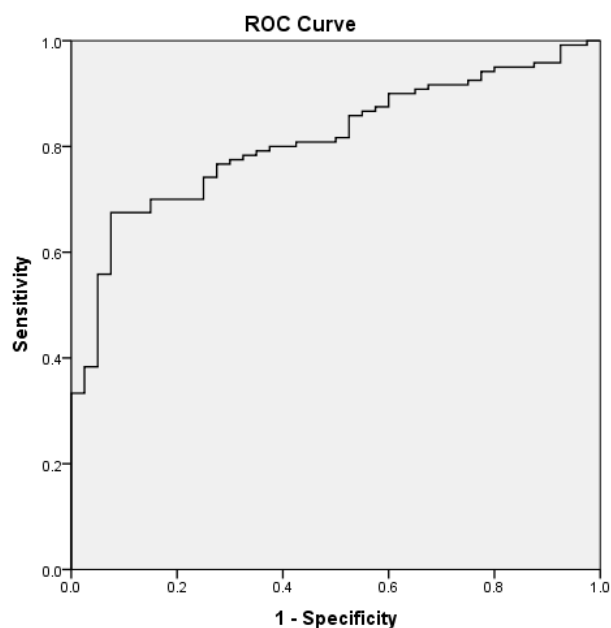


Tabla 20. Curva ROC elaborada a partir del modelo explicativo del tratamiento antiviral. En este modelo se incluyó la presencia de GPT elevada, la microcefalia, la presencia de esplenomegalia, la ictericia, la PCR positiva en el LCR y las alteraciones ecográficas al nacer).

7.1.7 Seguimiento y secuelas neurosensoriales

Durante los primeros 12 meses de vida falleció un solo niño (1/297; 0,3%).

Variables antropométricas

En la tabla 20 se recogen las variables antropométricas que se estudiaron a los 6 y 12 meses de edad.

	6 meses de edad		12 meses de edad	
	n	% o media (SD)	n	% o media (SD)
Peso (kg)	184	6,7(1,4)	147	8,7 (1,4)
Peso Z score	184	-0,84(1,3)	147	-1,2(1,4)
Talla (cm)	169	63,7(4,9)	133	72,5(4,8)
Talla Z score	169	-0,8 (1,5)	133	-0,7(1,2)
Perímetro craneal (cm)	181	41,6 (3)	150	44,6(2,3)
Z score	181	-1(1,6)	150	-1,0(1,8)
Microcefalia (-2 Z score)	43/186	23,1%	32/155	20,6%

Tabla 21. Variables antropométricas evaluadas a los 6 y 12 meses. n es el número de pacientes con la datos disponibles a los 6 y 12 meses.

Hipoacusia a los 6 y 12 meses de edad

Se estudió la presencia de hipoacusia en el periodo neonatal y a los 6 y 12 meses de edad. Presentaron hipoacusia el 36,5% de los recién nacidos, un 37,9% a los 6 meses de edad y un 44,2% a los 12 meses de edad (tabla 22). Se detectó un empeoramiento significativo de la hipoacusia (aumento en la categoría de gravedad) en el mejor oído el 5,1% (n=8) de los niños a los 6 meses y un 9,8% (n=12) a los 12 meses (tabla 22).

	Neonato		6 meses de edad		12 meses de edad	
	n	% o media	n	% o media	n	% o media
		(SD)		(SD)		(SD)
Hipoacusia en algún oído (> 25 dB)	85/233	36,5%	74/195	37,9%	69/156	44,2%
Hipoacusia en el mejor oído (>25 dB)	63/204	30,9%	52/166	31,3%	40/126	31,7%
Leve (26-45 dB)	31/204	15,2%	30/166	18,1%	22/126	17,5%
Moderada (46-70 dB)	15/204	7,4%	9/166	5,4%	8/126	6,3%
Grave (71-90 dB)	11/204	5,4%	6/166	3,6%	5/126	4%
Profunda (> 90 dB)	6/204	2,9%	7/166	4,2%	5/126	4%
dB en el mejor oído	204	30,8(21,2)	166	30,2 (20,7)	126	30,2(21)
Cambio en dB en el mejor oído	--	--	157	0,6 (11,8)	123	0,2 (12)
Empeora audición en el mejor oído	--	--	8/157	5,1%	12/123	9,8%

Tabla 22. Evaluación auditiva mediante PEATC al nacimiento y a los 6 y 12 meses de edad. Se considera hipoacusia la presencia de un umbral ≥ 25 dB en al menos uno de los oídos.

Alteraciones neurológicas a los 6 y 12 meses de edad

Se recogió la presencia de alteraciones neurológicas a los 6 y 12 meses de edad.

El 21,2% de los niños presentaron alteraciones neurológicas a los 6 meses de edad y un 29,8% a los 12 meses.

	6 meses de edad		12 meses de edad	
	n	%	n	%
Alteraciones neurológicas	43/203	21,2%	50/168	29,8%

Tabla 23. Presencia de alteraciones neurológicas a los 6 y 12 meses de edad.

7.2 Relación entre las variables gestacionales y la presencia de de hipoacusia y alteraciones neurológicas

7.2.1 Pruebas de imagen fetales

El 14,3% de los fetos tenían alteraciones ecográficas en el segundo trimestre de gestación, este porcentaje aumentaba hasta el 47% en el tercer trimestre. El hallazgo más frecuentemente observado en ambos trimestres es el crecimiento intrauterino retardado.

Hallazgos ecográficos	Segundo trimestre		Tercer trimestre	
	n	%	n	%
Normal	114	85,7	87	53
Alterada	19	14,3	77	47
Crecimiento intrauterino retardado	7	5,3	46	28
Microcefalia ($-2 < Z$ score)	2	1,5	7	4,3
Ventriculomegalia	3	2,3	8	4,9
Quistes periventriculares	0	0	8	4,9
Calcificaciones intracraneales	3	2,3	5	3
Hidrocefalia	3	2,3	6	3,7
Aumento de cisterna magna	1	0,8	4	2,4
Lisencefalia y otras alteraciones de la migración	0	0	2	1,2
Hipoplasia cerebelosa	1	0,8	4	2,4
Lesiones parenquimatosas	2	1,5	3	1,8
Adhesiones ventriculares	0	0	3	1,8
Alteraciones de la sustancia blanca	1	0,8	4	2,4
Oligoamnios	3	2,3	10	6,1

Polihidramnios	0	0	2	1,2
Cardiomegalia	1	0,8	5	3
Hepatomegalia	1	0,8	3	1,8
Esplenomegalia	0	0	3	1,8
Hiperecogenicidad intestinal	3	2,3	4	2,4
Ascitis	0	0	1	0,6
Derrame pleural	0	0	1	0,6
Otras	6	4,5	9	5,5

Tabla 24. Hallazgos ecográficos compatibles con una infección fetal por CMV en el segundo y tercer trimestre. Número total de fetos con dichos hallazgos (n) y porcentaje dentro del total de fetos evaluados.

Disponemos de los datos de la resonancia fetal de 26 casos, presentando alteraciones un 58,6% de los fetos estudiados. La hidrocefalia y las alteraciones de la sustancia blanca son los hallazgos que más frecuentemente se encontraron en la resonancia fetal.

Hallazgos en la resonancia fetal		
	n	%
Normal	12	41,4
Alterada	17	58,6
Crecimiento intrauterino retardado	1	3,4
Microcefalia ($-2 < Z$ score)	4	13,8
Ventriculomegalia	5	17,2
Quistes periventriculares	4	13,8
Calcificaciones intracraneales	2	6,9
Hidrocefalia	8	27,6
Aumento de cisterna magna	3	10,3

Lisencefalia y otras alteraciones de la migración	3	10,3
Hipoplasia cerebelosa	1	3,4
Lesiones parenquimatosas	2	1,5
Lesiones isquémicas cerebrales	2	6,9
Adhesiones ventriculares	2	6,9
Alteraciones de la sustancia blanca	7	24,1
Cardiomegalia	2	6,9
Vasculopatía lentículoestriada	2	6,9
Otras	2	6,9

Tabla 25. Hallazgos en la resonancia magnética fetal compatibles con una infección por CMV. Número total de fetos con dichos hallazgos (n) y porcentaje dentro del total de fetos evaluados.

Al comparar las ecografías fetales con los resultados obtenidos en la resonancia tras el nacimiento, la sensibilidad de la ecografía fetal para detectar lesiones en el SNC en el segundo y tercer trimestre es del 23,4% y 69,5% respectivamente (tabla 26). El AUC en el segundo y tercer trimestre fue de 0,564 (0,4-0,7) y de 0,657 (0,5-0,8). En cuanto a la resonancia fetal, la sensibilidad comparada con la resonancia postnatal fue del 80%, con una AUC del 0,9 (0,74-1). Los cocientes de probabilidad de la ecografía y la resonancia fetales para la detección de lesiones en SNC se han recogido en la tabla 26.

	AUC (IC95%)	LR positivo	LR negativo
Ecografía fetal segundo trimestre	0,564 (0,4-0,7)	2,56	0,85
Ecografía fetal tercer trimestre	0,657 (0,5-0,8)	2,16	0,46
Resonancia magnética fetal	0,9 (0,74-1)	∞	0,2

Tabla 26. Áreas bajo la curva (AUC) e intervalo de confianza al 95% de las curvas ROC de la ecografía fetal del segundo y tercer trimestre y de la resonancia magnética fetal, para la detección de lesiones del SNC al nacimiento. Se comparan estas pruebas con la resonancia magnética neonatal. Likelihood ratio (LR) positivo y negativo de las 3 pruebas.

Hasta dos tercios de los fetos con una ecografía fetal normal en el segundo trimestre y casi la mitad de los fetos con una ecografía normal al tercer trimestre presentaron alteraciones en la RMN craneal tras el parto, por lo que una ecografía fetal normal no descarta la presencia de alteraciones en el SNC en el neonato (figura 13). Aunque la especificidad de la resonancia fetal es alta, tiene una sensibilidad limitada para detectar las lesiones menos graves.

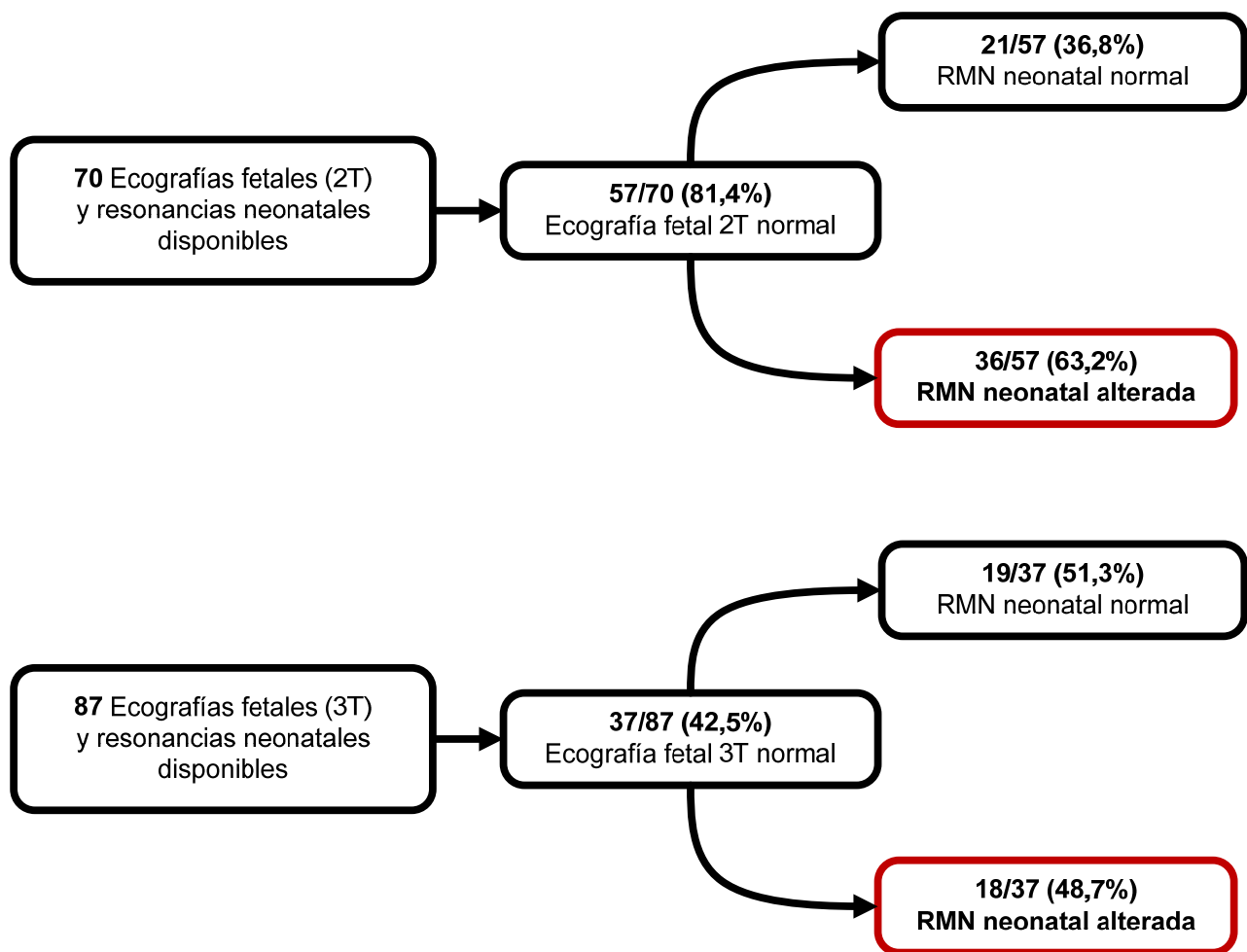


Figura 13. Presencia de alteraciones en la resonancia magnética nuclear (RMN) neonatal en niños con ecografías fetales normales en el segundo y tercer trimestre.

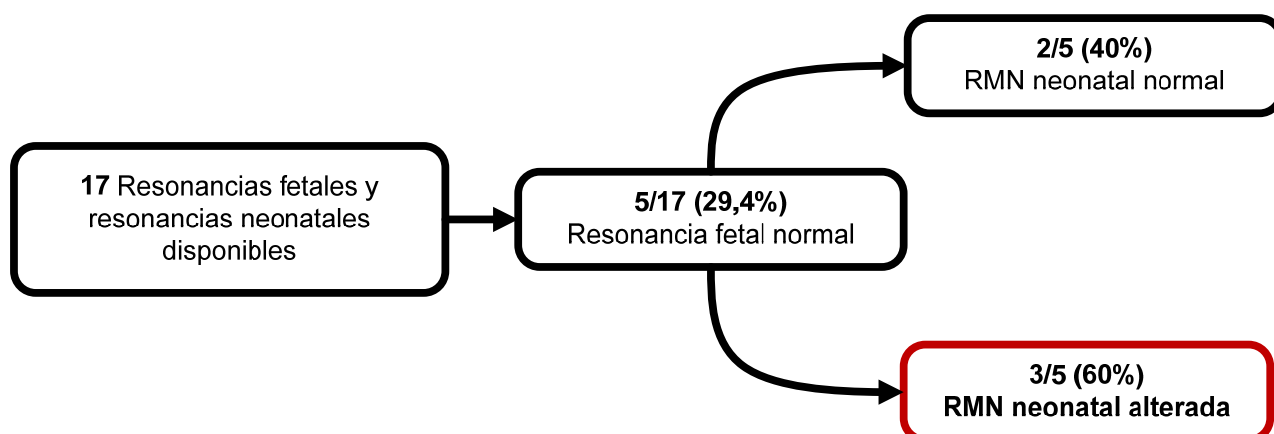


Figura 14. Presencia de alteraciones en la resonancia magnética nuclear (RMN) neonatal en niños con resonancias fetales normales.

7.2.2 Relación entre las variables gestacionales y el desarrollo de secuelas neurosensoriales.

Se evaluó la posible asociación de diferentes variables gestacionales con el desarrollo de secuelas neurosensoriales a los 6 y 12 meses de edad. En el análisis univariado, se estudió la asociación del resultado de las ecografías fetales y de la resonancia magnética nuclear fetal, la administración de inmunoglobulina hiperinmune anti CMV (HIG) durante la gestación y el momento estimado de la infección fetal, con el desarrollo de secuelas.

La presencia de alteraciones en la ecografía fetal es el factor de riesgo más importante, tanto para el desarrollo de hipoacusia (OR: 2,7 IC95%(1,3-5,8) y OR: 3 IC95%(1,3-7)) como de alteraciones neurológicas (OR: 3,3 IC95%(1,3-8,5) y OR: 3,4 IC95%(1,-8,4)) a los 6 y 12 meses respectivamente (tablas 27 y 28). El

incremento de la edad gestacional en el momento de la infección fetal reduce el riesgo de secuelas a los 6 meses, aunque estos hallazgos no persisten a los 12 meses de edad.

	Hipoacusia a los 6 meses		Hipoacusia a los 12 meses	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Ecografía fetal alterada (tercer trimestre)	2,7 (1,3-5,8)	0,008	3 (1,3-7)	0,01
Resonancia magnética fetal alterada	5,6 (0,7-42,3)	0,16	3,5 (0,3-43,2)	0,5
Tratamiento con inmunoglobulinas	1,3 (0,5-3,4)	0,6	1,01 (0,3-3)	0,98
Edad gestacional en momento de la infección	0,88 (0,82-0,97)	0,006	0,97 (0,9-1,03)	0,3

Tabla 27. Análisis univariado de asociación de las variables gestacionales (ecografías, resonancia fetal, tratamiento con inmunoglobulina hiperinmune y la edad gestacional en el momento de la infección materna) con la presencia de hipoacusia a los 6 y 12 meses.

	Alteraciones neurológicas a los 6 meses		Alteraciones neurológicas a los 12 meses	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Ecografía fetal alterada (tercer trimestre)	3,3 (1,3-8,5)	0,012	3,4 (1,4-8,4)	0,007
Resonancia magnética fetal alterada	1,6 (1,1-2,3)	0,12	3 (1,2-7,6)	0,03
Tratamiento con inmunoglobulinas	0,7 (0,2-2,7)	0,8	0,98 (0,3-3)	0,98
Edad gestacional en el momento de la infección	0,8 (0,6-0,95)	0,015	0,94 (0,9-1,02)	0,15

Tabla 28. Análisis univariado de asociación de las variables gestacionales (ecografías, resonancia fetal, tratamiento con inmunoglobulina hiperinmune y la edad gestacional en el momento de la infección materna) con la presencia de alteraciones neurológicas a los 6 y 12 meses.

Se realizó una comparación de las medias de la edad gestacional en el momento de la infección fetal en función de la presencia o no de secuelas. Los niños con hipoacusia y con alteraciones neurológicas a los 6 meses se habían infectado antes que los niños asintomáticos (figuras 15 y 17), aunque estos hallazgos no se pudieron confirmar a los 12 meses de edad (figuras 16 y 18)

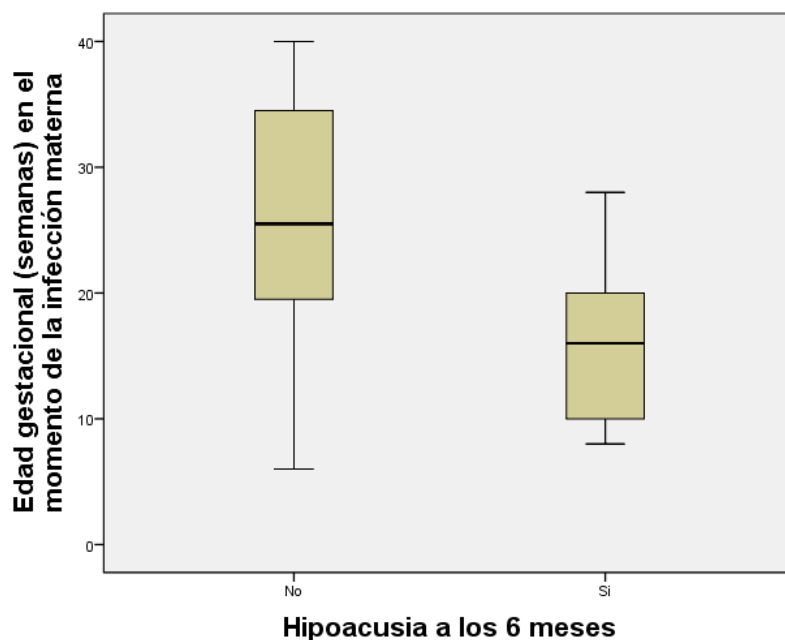


Figura 15. Edad gestacional en semanas en el momento de la infección materna, en función de la presencia o no de hipoacusia a los 6 meses. ($p=0,002$)

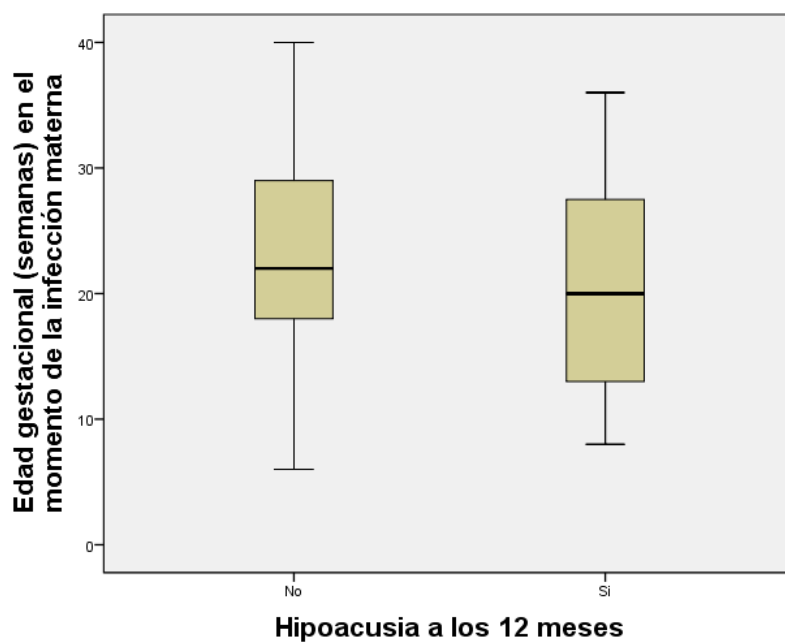


Figura 16. Edad gestacional en semanas en el momento de la infección materna, en función de la presencia o no de hipoacusia a los 12 meses. ($p=0,3$)

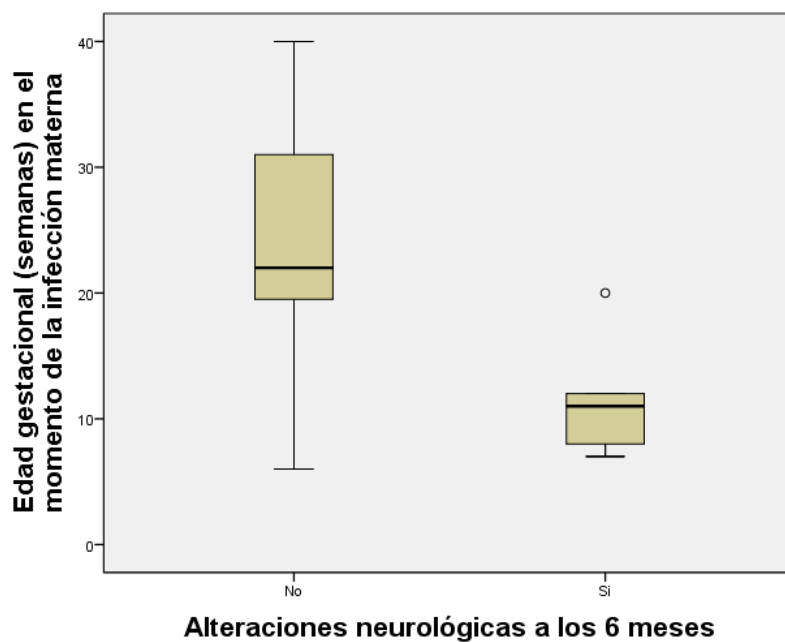


Figura 17. Edad gestacional en semanas en el momento de la infección materna, en función de la presencia o no de alteraciones neurológicas a los 6 meses. ($p=0,001$)

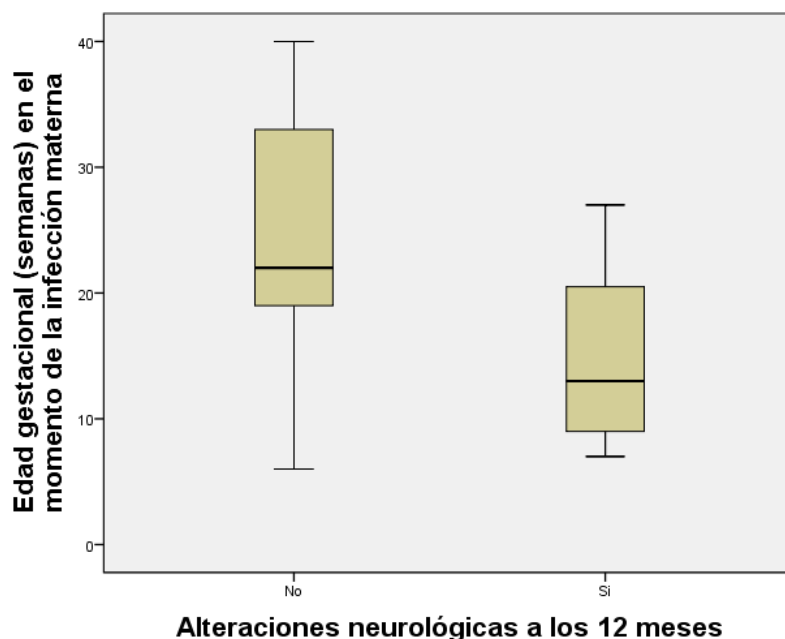


Figura 18. Edad gestacional en semanas en el momento de la infección materna, en función de la presencia o no de alteraciones neurológicas a los 12 meses. ($p=0,14$)

Para estudiar el riesgo de secuelas en relación con el resultado de las ecografías fetales, ajustado por el momento de la infección fetal, se desarrolló un modelo de regresión logística que incluía estas dos variables. La presencia de alteraciones en la ecografía fetal se asoció independientemente de la edad gestacional con el desarrollo de hipoacusia y alteraciones neurológicas a los 12 meses de edad, con una OR ajustado de 9,9 (1,5-65,9) ; ($p=0,017$) y 61,5 (4,7-802,4); $p= 0,002$ respectivamente (tablas 29 y 30). La edad gestacional es un factor protector de hipoacusia y de alteraciones neurológicas a los 6 meses aunque, estos hallazgos no se pudieron comprobar a los 12 meses (tablas 29 y 30).

	Hipoacusia a los 6 meses		Hipoacusia a los 12 meses	
	OR Ajustada (IC95%)	p	OR Ajustada (IC95%)	p
Ecografía fetal alterada (tercer trimestre)	6 (0,8-46,4)	0,08	9,9 (1,5-65,9)	0,017
Edad gestacional en el momento de la infección	0,8 (0,7-0,97)	0,02	0,96 (0,9-1,06)	0,4

Tabla 29. Modelo de regresión logística que incluye la alteración de la ecografía fetal y la edad gestacional en el momento de la infección materna (semanas) y su asociación con el desarrollo de hipoacusia a los 6 y 12 meses.

	Alteraciones neurológicas a los 6 meses		Alteraciones neurológicas a los 12 meses	
	OR Ajustada (IC95%)	p	OR Ajustada (IC95%)	p
Ecografía fetal alterada (tercer trimestre)	4,8 (0,3-85,5)	0,2	61,5 (4,7-802,4)	0,002
Edad gestacional en el momento de la infección	0,7 (0,5-0,1,02)	0,07	0,96 (0,8-1,1)	0,6

Tabla 30. Modelo de regresión logística que incluye la alteración de la ecografía fetal y la edad gestacional en el momento de la infección materna (semanas) y su asociación con el desarrollo de alteraciones neurológicas a los 6 y 12 meses.

7.3 Relación entre las variables neonatales y el desarrollo de secuelas neurológicas y auditivas.

7.3.1 Carga viral en sangre al nacer y presencia de hipoacusia y alteraciones neurológicas a los 6 y 12 meses de edad.

Disponemos del resultado de la PCR en sangre al nacer en 140 niños. En el 84,8% de los casos la PCR resultó positiva. La presencia de una PCR positiva en sangre no se asoció a un mayor riesgo de secuelas neurológicas o de hipoacusia a los 12 meses ($p=0,7$ y $p=0,5$, respectivamente). Se realizó una carga viral en sangre al nacer en 118 casos. Se compararon las medias de las cargas virales de los pacientes con hipoacusia y alteraciones neurológicas) con la de los pacientes sin secuelas y no se observaron diferencias significativas ni a los 6 ni a los 12 meses (hipoacusia: $p=0,3$ y $p=0,7$; alteraciones neurológicas: $p=0,9$ y $p=0,3$; ver figuras).

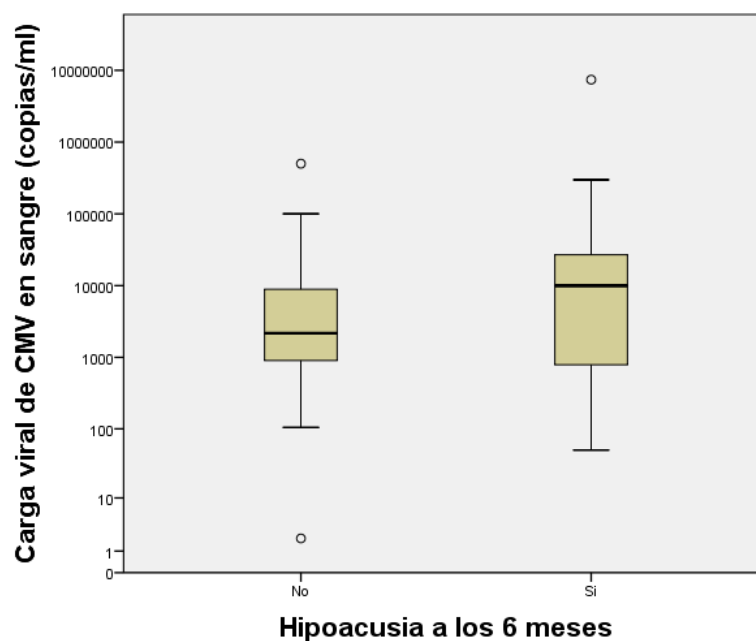


Figura 19. Comparación de la carga viral de CMV en sangre (copias/mL) al nacimiento entre los niños con y sin hipoacusia a los 6 meses. ($p=0,3$)

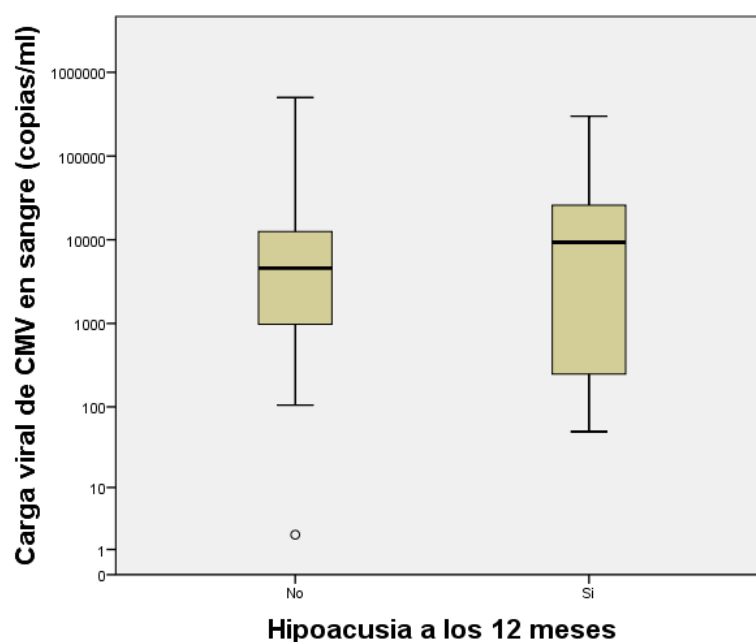


Figura 20. Comparación de la carga viral de CMV en sangre (copias/mL) al nacimiento entre los niños con y sin hipoacusia a los 12 meses. ($p=0,7$)

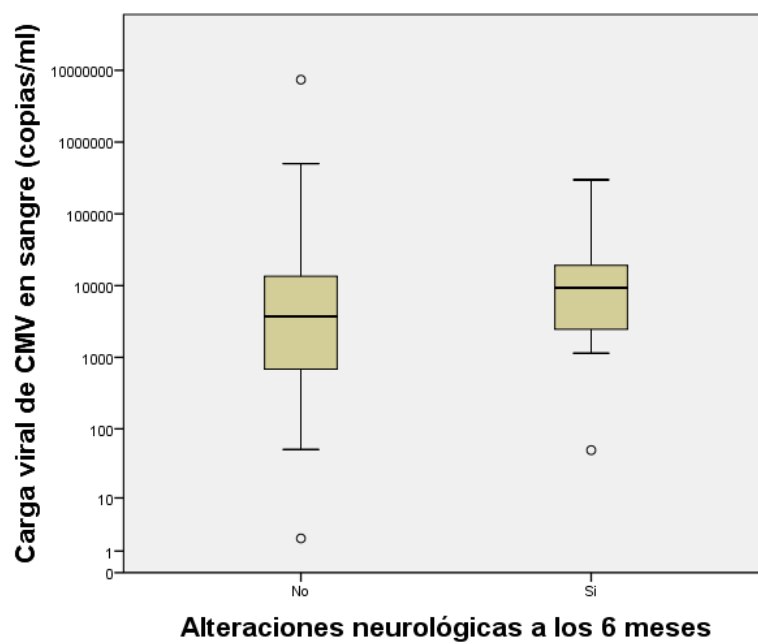


Figura 21. Comparación de la carga viral de CMV en sangre (copias/mL) al nacimiento entre los niños con y sin alteraciones neurológicas a los 6 meses. ($p=0,9$)

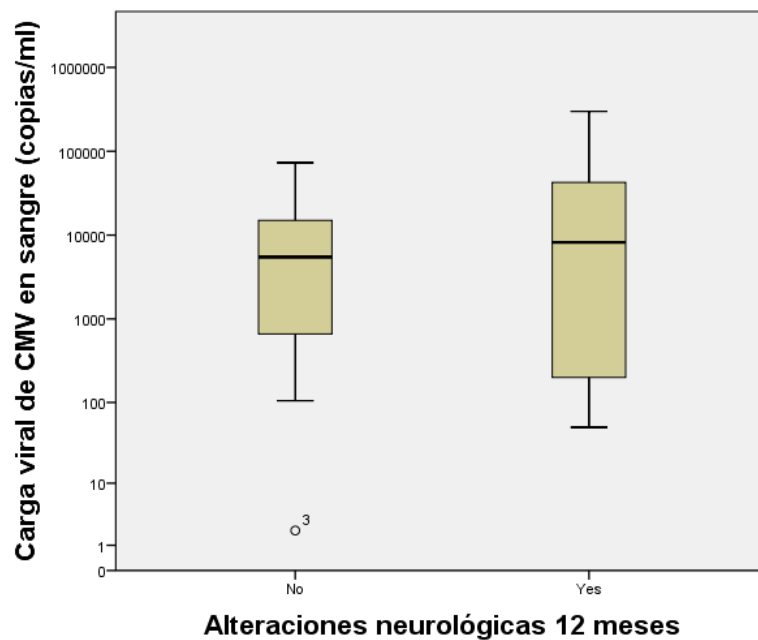


Figura 22. Comparación de la carga viral de CMV en sangre (copias/mL) al nacimiento entre los niños con y sin alteraciones neurológicas a los 12 meses. ($p=0,3$)

La curva ROC de la carga viral al nacimiento en relación con el desarrollo de hipoacusia a los 12 meses presentó un AUC de 0,55 (IC95%: 0,4-0,7).

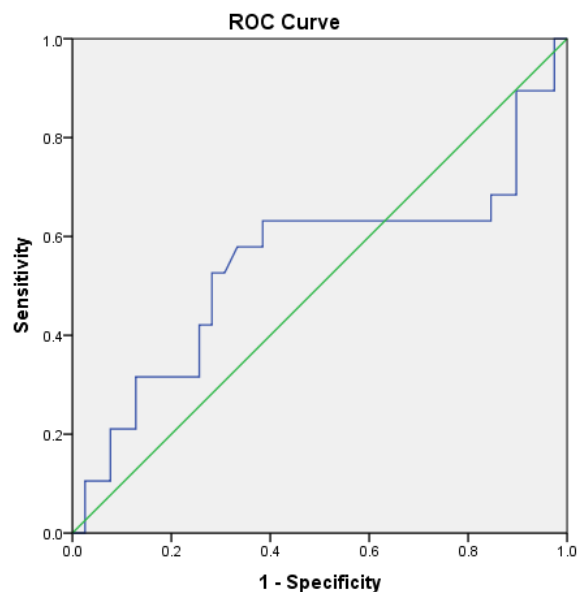


Figura 23. Curva ROC de la carga viral al nacimiento en relación con la presencia de hipoacusia a los 12 meses de edad.

7.3.2 Relación entre las variables neonatales y la presencia de hipoacusia a los 6 y 12 meses de edad

En el análisis univariado se estudiaron las variables neonatales que desde un punto de vista teórico podrían estar asociadas al riesgo de secuelas auditivas. Se incluyó la presencia de trombopenia, neutropenia, elevación de GPT, la presencia de microcefalia (con y sin ajustar por el peso), esplenomegalia, ictericia, bajo peso para la edad gestacional, las alteraciones en la ecografía

transfontanelar al nacer, la edad gestacional al parto y la presencia de hipoacusia al nacimiento.

La trombopenia (<100.000 plaquetas/ μ L), la esplenomegalia al nacimiento, la presencia de alteraciones en la ecografía transfontanelar neonatal y la hipoacusia al nacimiento se asociaron a un mayor riesgo de detectar hipoacusia en el seguimiento (tabla 31) .

	Hipoacusia a los 6 meses		Hipoacusia a los 12 meses	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Plaquetas < 100.000 cs / μ L	2,3 (1,03-5,2)	0,039	1,8 (0,7-4,7)	0,19
Neutrofilos < 500 cs/ μ L	0,92(0,1-10,5)	1,0	0,8 (0,07-8,8)	1,0
GPT > 80 UI/L	1,8 (0,6-6,0)	0,3	4,7 (0,9-24,5)	0,066
Microcefalia	2,0(0,6-6,3)	0,2	1,5 (0,5-4,7)	0,5
Microcefalia ajustada por el peso al nacer	1,6 (0,097-25,7)	1,0	0,5 (0,5-0,6)	0,5
Esplenomegalia	5,8 (1,8-18,6)	0,001	4,2 (1,1-16,2)	0,026
Ictericia	2,5 (0,8-8,1)	0,14	1,6 (0,5-5,4)	0,54
Bajo peso para la edad gestacional (< -2 Z score)	0,6 (0,3-1,7)	0,5	0,7 (0,3-1,9)	0,5
Alteraciones en ecografía cerebral al nacimiento	4,7 (2,4-9,1)	0,0001	3,7 (1,7-7,6)	0,0001
Edad gestacional al nacimiento	1,013 (0,93-1,1)	0,77	1,02 (0,93-1,1)	0,67
Hipoacusia en algún oído (dB >25)	95 (34,4-262,2)	0,0001	44,4 (15,6-109,5)	0,0001

Tabla 31. Análisis univariado de las distintas variables neonatales con la presencia de hipoacusia en el seguimiento.

	Hipoacusia a los 6 meses		Hipoacusia a los 12 meses	
	n	(%)	n	(%)
Plaquetas < 100.000 cs / μ L	17/32	53	12/23	52
Neutrófilos < 500 cs/ μ L	1/3	33,3	1/3	33,3
GPT > 80 UI/L	6/12	50	6/8	75
Microcefalia	7/13	54	7/13	54
Microcefalia ajustada por el peso al nacer	1/2	50	0/2	0
Esplenomegalia	13/17	76,5	9/12	75
Ictericia	8/13	61,5	6/11	54,5
Bajo peso para la edad gestacional (< -2 Z score)	7/24	29,2	7/19	36,8
Alteraciones en ecografía cerebral al nacimiento	38/64	59,4	28/46	60,9
Edad gestacional al nacimiento	--	--	--	--
Hipoacusia en algún oído (dB >25)	61/68	89,7	52/59	88,1

Tabla 32. Número y porcentaje de niños que desarrollan hipoacusia sobre el total de niños con un factor de riesgo determinado.

Análisis multivariante

Se elaboró un modelo de regresión logística multivariante en el que se censuró la muestra por valores perdidos (en la tabla figura el número (n) de pacientes incluidos en cada análisis) y se incluyeron aquellas variables significativas en el análisis univariado (trombopenia, esplenomegalia, la presencia de una ecografía alterada y la presencia de hipoacusia al nacer). La presencia de hipoacusia al nacimiento se asoció de manera independiente a la existencia de hipoacusia a

los 6 y 12 meses de vida (OR= 51,3 IC95% (15,2-173,5); p=0,0001 y OR= 33,2 IC95% (9,8-112,4); p=0,0001 respectivamente). La esplenomegalia al nacer aumenta el riesgo de presentar hipoacusia a los 6 meses de edad, aunque esta asociación no fue significativa a los 12 meses de edad.

Regresión logística multivariante	Hipoacusia a los 6 meses		Hipoacusia a los 12 meses	
	n=133		n=101	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Plaquetas < 100.000 cs / μ L	0,8 (0,15-4)	0,8	0,8 (0,1-4,8)	0,8
Esplenomegalia	13,7 (1,5-128,6)	0,022	5,2 (0,4-5,2)	0,2
Alteraciones en ecografía al nacimiento	1,3(0,4-4,6)	0,7	1,4 (0,3-5,2)	0,6
Hipoacusia en algún oído (dB \geq 25)	51,3 (15,2-173,5)	0,0001	33,2 (9,8-112,4)	0,0001

Tabla 33. Modelo de regresión logística multivariante para las variables relacionadas con la presencia de hipoacusia a los 6 y 12 meses. n es el número de niños incluidos en cada análisis.

Se incluyó la trombopenia, la esplenomegalia, las alteraciones ecográficas y la hipoacusia al nacimiento.

7.3.3 Relación entre las variables neonatales y la presencia de alteraciones neurológicas a los 6 y 12 meses de edad

Se estudió de igual modo la asociación entre las variables potencialmente predictoras y la presencia de alteraciones neurológicas en el seguimiento. Se incluyó en el análisis univariado las siguientes variables: la presencia de trombopenia, neutropenia, elevación de la GPT, microcefalia (con y sin ajustar

por el peso), esplenomegalia, ictericia, bajo peso para la edad gestacional, las alteraciones en la ecografía transfontanelar al nacer, la edad gestacional al parto y la hipoacusia al nacimiento. En el análisis univariado, la trombopenia, el incremento de la GPT > 80 UI/L, la esplenomegalia, las alteraciones en la ecografía cerebral y la existencia de hipoacusia al nacer estaban asociadas a la presencia de alteraciones neurológicas.

	Alteraciones neurológicas 6 meses		Alteraciones neurológicas 12 meses	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Plaquetas < 100.000 cs / μ L	3,8 (1,6-8,9)	0,002	2,2 (0,9-5,4)	0,079
Neutrofilos < 500 cs/ μ L	0,8(0,8-0,9)	1,0	0,7 (0,7-0,8)	1,0
GPT > 80 UI/L	7,8 (2,3-26,2)	0,0001	10,6 (2-56,4)	0,001
Microcefalia	1,4(0,4-4,5)	0,5	1,2 (0,3-4,2)	0,8
Microcefalia ajustada por el peso al nacer	0,8 (0,7-8,7)	1,0	0,7 (0,6-0,8)	1,0
Esplenomegalia	2,8 (1,1-7,4)	0,04	3,6 (1,2-10,9)	0,03
Ictericia	2,2 (0,7-6,7)	0,18	2,1 (0,6-7,1)	0,3
Pequeño para la edad gestacional (< -2 Z score)	1,3 (0,5-3,2)	0,6	1,1 (0,4-2,9)	0,8
Alteraciones en ecografía cerebral al nacimiento	5,4 (2,5-11,6)	0,0001	4 (1,9-8,6)	0,0001
Edad gestacional al nacimiento	0,94 (0,85-1,03)	0,93	0,9 (0,85-1,03)	0,23
Hipoacusia en algún oído al nacimiento (dB\geq25)	4,9 (2,3-10,4)	0,0001	6,2 (2,9-12,9)	0,0001

Tabla 34. Análisis univariado de las distintas variables neonatales con la presencia de alteraciones neurológicas en el seguimiento.

	Alteraciones neurológicas		Alteraciones neurológicas 12	
	6 meses		meses	
	n	(%)	n	(%)
Plaquetas < 100.000 cs / μ L	13/35	37,1	11/27	40,7
Neutrófilos < 500 cs/ μ L	1/3	33,3	1/2	50
GPT > 80 UI/L	7/13	53,8	6/8	75
Microcefalia	4/15	26,7	4/12	33,3
Microcefalia ajustada por el peso al nacer	1/2	50	0/2	0
Esplenomegalia	8/21	38,1	8/14	57,1
Ictericia	5/15	33,3	5/11	45,5
Bajo peso para la edad gestacional (< -2 Z score)	7/28	25	7/22	31,8
Alteraciones en ecografía cerebral al nacimiento	38/64	59,4	28/46	60,9
Edad gestacional al nacimiento	--	--	--	--
Hipoacusia en algún oído (dB >25)	27/72	37,5	33/63	52,4

Tabla 35. Número y porcentaje de niños que desarrollan alteraciones neurológicas sobre el total de niños con un factor de riesgo determinado.

Análisis multivariante

Se elaboró un modelo de regresión logística multivariante en el que se censuró la muestra por valores perdidos y se incluyeron todas las variables que resultaron significativas en el análisis univariado: plaquetopenia, GPT elevada, esplenomegalia, las alteraciones ecográficas al nacimiento y la hipoacusia al

nacer. Tanto esta última, como tener una GPT mayor de 80 UI/L se asociaron de manera independiente con un mayor riesgo de alteraciones neurológicas en el seguimiento (tabla 36).

Regresión logística multivariante	Alteraciones neurológicas 6 meses		Alteraciones neurológicas 12 meses	
	n=130		n=103	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Plaquetas < 100.000 cs / μ L	2 (0,5-7,8)	0,3	0,6 (0,1-2,8)	0,6
GPT > 80 UI/L	6,1 (1,3-29,6)	0,024	7,5 (1,0-57,2)	0,05
Esplenomegalia	1,1 (0,2-5,8)	0,9	5,2 (0,9-32)	0,07
Alteraciones en ecografía cerebral al nacimiento	2,4 (0,5-9,8)	0,2	0,9 (0,2-3,4)	0,9
Hipoacusia en algún oído al nacimiento (dB >25)	5,9 (1,5-23)	0,01	6,9 (2,1-22,2)	0,001

Tabla 36. Modelo de regresión logística multivariante para las variables relacionadas con el desarrollo de alteraciones neurológicas. n es el número de niños incluidos en cada análisis. Se incluyó la trombopenia, la elevación de la GPT > 80 UI/L, la esplenomegalia, las alteraciones ecográficas y la hipoacusia al nacimiento.

7.4 Construcción de un modelo predictivo de desarrollo de hipoacusia y de alteraciones neurológicas

Uno de los objetivos principales del estudio es elaborar un modelo predictivo del riesgo de desarrollo de hipoacusia y de alteraciones neurológicas en el primer año de vida. Para ello, en primer lugar realizamos mediante una regresión logística un análisis univariado de la asociación de las variables

pronósticas con el desarrollo de secuelas en el primer año de vida. Se estudian todas las variables incluidas en la tabla 37. Se decide incorporar sin categorizar las variables continuas (número de plaquetas y valor de la GPT) para intentar obtener un modelo predictivo lo más exacto posible.

	Hipoacusia		Alteraciones neurológicas	
	12 meses		12 meses	
	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Plaquetas /10000 (cs/ μ L)	0,96 (0,93-0,99)	0,025	0,95 (0,92-0,98)	0,004
GPT (UI/L)	1,03 (1,006-1,044)	0,011	1,03 (1,01-1,05)	0,002
Microcefalia	1,5 (0,5-4,7)	0,5	1,2 (0,3-4,2)	0,8
Esplenomegalia	4,2 (1,1-16,2)	0,026	3,6 (1,2-10,9)	0,03
Ictericia	1,6 (0,5-5,4)	0,54	2,1 (0,6-7,1)	0,3
Pequeño para la edad gestacional (< -2 Z score)	0,7 (0,3-1,9)	0,5	1,1 (0,4-2,9)	0,8
Alteraciones en ecografía cerebral al nacimiento	3,7 (1,7-7,6)	0,0001	4 (1,9-8,6)	0,0001
Edad gestacional al nacimiento	1,02 (0,93-1,1)	0,67	0,9 (0,85-1,03)	0,23
Hipoacusia en algún oído (dB >25)	44,4 (15,6-109,5)	0,0001	6,2 (2,9-12,9)	0,0001

Tabla 37. Análisis univariado de las variables que se asocian a la presencia de hipoacusia y alteraciones neurológicas a los 12 meses. Las plaquetas se incluyen divididas por 10000, y la GPT y la edad gestacional al nacimiento se incluyen en forma de variables continuas.

Para determinar el mejor modelo posible se seleccionaron como potenciales variables predictivas aquellas que en el análisis univariado tenían una $p < 0,02$

- Plaquetas /10000 cs/ μ L

- GPT (UI/L)
- Esplenomegalia (Sí/No)
- Alteraciones en la ecografía transfontanelar neonatal (Sí/No)
- Hipoacusia al nacimiento (Sí/No)

Mediante el script AllSetsReg para SPSS elaborado por el Laboratori d' Estadística Aplicada de la Universitat Autònoma de Barcelona (JM Domenech y JB Navarro, 2013) se estudian los 31 submodelos posibles, tanto para el desarrollo de hipoacusia como para las alteraciones neurológicas y se eligen los mejores modelos predictivos según el menor valor obtenido en el criterio "Cp de Mallows".

7.4.1 Modelo predictivo de desarrollo de hipoacusia a los 12 meses de edad

El mejor modelo pronóstico para el desarrollo de hipoacusia incluye finalmente las siguientes variables:

- GPT (UI/L)
- Esplenomegalia (Sí/No)
- Hipoacusia al nacimiento (Sí/No)

Los valores de los términos de la ecuación del modelo predictivo del riesgo de desarrollo de hipoacusia se encuentran recogidos en la tabla 38:

	β	Error estándar
Hipoacusia al nacimiento en algún oído (> 25 dB)	3,42	0,67
GPT (UI/L)	0.008	0,012
Esplenomegalia (sí/no)	1,783	1,36
Constante	-2,01	0,492

Tabla 38. Tabla que presenta los coeficientes β y el error estándar de las tres variables incluidas en el modelo pronóstico de hipoacusia y de la constante.

El poder predictivo del modelo se estudia mediante el área bajo la curva ROC de las probabilidades predichas y su intervalo de confianza (tabla 39)

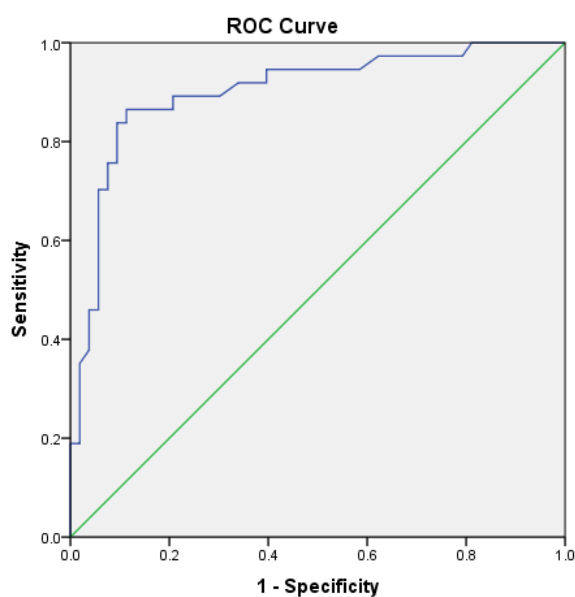


Figura 24. Área bajo la curva ROC para la presencia de hipoacusia los 12 meses en función del modelo pronóstico evaluado que incluye la hipoacusia al nacer, la esplenomegalia y el valor de la GPT al nacer.

	AUC	IC95%
Hipoacusia a los 12 meses	0,902	0,83-0,97

Tabla 39. Área bajo la curva ROC e IC95% para la presencia de hipoacusia los 12 meses en función del modelo pronóstico evaluado, que incluye la hipoacusia al nacer, la esplenomegalia y el valor de la GPT al nacer.

Fórmula de regresión del modelo predictivo del riesgo de presencia de hipoacusia a los 12 meses de vida:

$$\text{Ln Odds de Hipoacusia (12 meses de edad)} = -2,014 + (3,421 \times \text{presencia de hipoacusia al nacer}) + (0,008 \times \text{valor de GPT (UI/L)}) + (1,783 \times \text{presencia de esplenomegalia})$$

Tabla 40. Fórmula de regresión del modelo predictivo del riesgo de desarrollo de hipoacusia a los 12 meses de vida. Las variables dicotómicas siempre toman valor 1 (Si) y 0 (No).

Ln: logaritmo neperiano

Para poder conocer de manera sencilla una predicción del riesgo de desarrollo de hipoacusia que tiene un paciente con unas características concretas, se elabora la tabla 41. En ella se recogen valores teóricos de las distintas variables y la estimación del riesgo de desarrollo de hipoacusia en función de estos datos. Por ejemplo, un niño que no presenta hipoacusia al nacer, sin esplenomegalia y

con un valor de GPT de 20 UI/L tiene un 14% de probabilidad de presentar hipoacusia en el primer año de vida. En cambio un niño sin hipoacusia al nacer pero con esplenomegalia y con un valor de GPT de 50 UI/L tiene un 54% de posibilidades de presentar hipoacusia.

Hipoacusia al nacer	Esplenomegalia	GPT (UI/L)						
		20	50	80	110	140	170	200
No	No	.1357791	.1671537	.2040663	.2467155	.2949749	.3483093	.4057375
	Si	.4829587	.5440536	.6038509	.6606968	.7132589	.7606286	.8023414
Si	No	.8277549	.8599245	.8869067	.9092400	.9275234	.9423572	.9543045
	Si	.9661836	.9733323	.9790026	.9834877	.9870275	.9898163	.9920104

Tabla 41. Tabla de probabilidades de presentar hipoacusia a los 12 meses según el modelo evaluado, en función de la presencia de hipoacusia al nacer, esplenomegalia y valores de la GPT (UI/L).

7.4.2 Modelo predictivo de alteraciones neurológicas a los 12 meses de edad

Se repite el mismo procedimiento para elaborar el modelo predictivo de la presencia de alteraciones neurológicas a los 12 meses de edad.

El mejor modelo predictivo de todos los estudiados incluye finalmente estas variables:

- GPT (UI/L)
- Alteraciones en la ecografía transfontanelar neonatal (Si/No)
- Hipoacusia al nacimiento (Sí/No)

Se elabora también una ecuación del modelo pronóstico donde los coeficientes toman los siguientes valores (tabla 42).

	β	Error estándar
Hipoacusia al nacimiento en algún oído (> 25 dB)	1,54	0,571
GPT (UI/L)	0,025	0,011
Ecografía alterada (sí/no)	0,248	0,599
Constante	-2,722	0,523

Tabla 42. Tabla que presenta los coeficientes β y el error estándar de las cuatro variables incluidas en el modelo pronóstico de alteraciones neurológicas y de la constante.

De igual modo, se estudia el poder predictivo del modelo para conocer la probabilidad de desarrollo de secuelas neurológicas mediante la curva ROC (figura 25) de las probabilidades predichas y su intervalo de confianza (tabla 43).

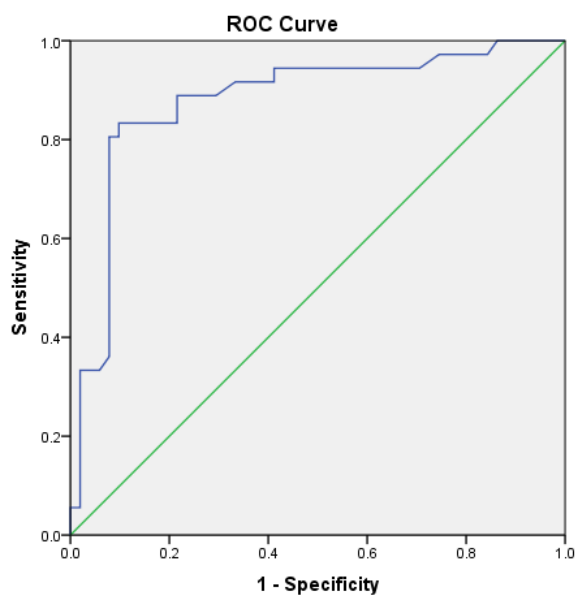


Figura 25. Área bajo la curva ROC para la presencia de alteraciones neurológicas a los 12 meses, en función del modelo pronóstico evaluado, que incluye la hipoacusia al nacer, la alteración de la ecografía y el valor de la GPT al nacer.

	AUC	IC95%
Alt. neurológicas a los 12 meses	0,88	0,8-0,96

Tabla 43. Área bajo la curva ROC e IC95% para la presencia de alteraciones neurológicas a los 12 meses, en función del modelo pronóstico evaluado, que incluye la hipoacusia al nacer, la alteración de la ecografía y el valor de la GPT al nacer.

Fórmula de regresión del modelo predictivo del riesgo de alteraciones neurológicas a los 12 meses de vida:

$$\text{Ln Odds de Alteraciones neurológicas (12 meses de edad)} = -2,722 + (1,54 \times \text{presencia de hipoacusia al nacer}) + (0,025 \times \text{valor de GPT (UI/L)}) + (0,248 \times \text{ecografía neonatal alterada})$$

Tabla 44. Fórmula de regresión del modelo predictivo del riesgo de alteraciones neurológicas a los 12 meses de vida. Las variables dicotómicas siempre toman valor 1 (Si) y 0 (No).

Se realiza también una tabla (tabla 45) donde se recoge la probabilidad de presencia de alteraciones neurológicas a los 12 meses de vida, para unos pacientes teóricos, de tal modo que sea posible conocer de manera rápida el riesgo de un niño con características similares.

Ecografía alterada	Hipoacusia al nacer	GPT (UI/L)						
		20	50	80	110	140	170	200
No	No	.0979925	.1874928	.3289279	.5100759	.6886158	.8244804	.9089060
	Si	.3363848	.5184666	.6957725	.8292886	.9116492	.9563653	.9789717
Si	No	.1222462	.2282918	.3858868	.5716807	.7392470	.8575887	.9274896
	Si	.3938771	.5798854	.7456698	.8616421	.9297165	.9656331	.9835208

Tabla 45. Tabla de las probabilidades de presentar alteraciones neurológicas a los 12 meses según el modelo evaluado, en función de la presencia de hipoacusia al nacer, alteraciones en la ecografía y los valores de la GPT (UI/L).

7.5 Relación entre el resultado de la PCR en el LCR y el desarrollo de hipoacusia y alteraciones neurológicas

En nuestra muestra se realizó una punción lumbar en 166 niños. En 24 casos la punción se realizó fuera del periodo neonatal o se desconocía la fecha exacta de su realización, por lo que se decidió excluir a estos pacientes del análisis y finalmente se incluyó a 142 niños. La PCR resultó positiva en 24 niños (16,9%). La mediana de edad al realizar la punción lumbar fue de 6 días RIQ [2-10,5]. El 73,8% de los niños con una PCR positiva en LCR presentaban síntomas al nacer frente a un 50,8% de los niños con PCR negativa ($p=0,042$). Para conocer el riesgo de desarrollo de secuelas que presentan los niños con PCR positiva en el LCR se realizó un análisis estratificado en función de la presencia o no de alteraciones en la ecografía transfontanelar neonatal. Se realizó el análisis de las secuelas sólo a los 6 meses de edad por el escaso número de pacientes con punción lumbar realizada de los que teníamos datos a los 12 meses de edad. La presencia de una PCR positiva en LCR se asoció a un mayor riesgo de presentar hipoacusia a los 6 meses en el grupo de niños con ecografía transfontanelar alterada ($OR= 13,9$ (1,5-125,6); $p=0,009$), pero no se han encontrado diferencias significativas entre los niños sin alteraciones en la ecografía (tabla 46). La presencia de una PCR positiva en LCR se asoció a un resultado positivo de la PCR en sangre ($p=0,045$). Al comparar la carga viral media en sangre entre los niños con PCR positiva en el LCR y aquellos con PCR negativa no encontramos diferencias significativas: ($p=0,6$) 24902,3 copias/mL

(SD=31453,1) frente a 44138 copias/mL (SD=166263,5) respectivamente (figura 26).

Alteraciones en ecografía neonatal	Resultado de la PCR en el LCR	Hipoacusia (6 m)			Alteraciones neurológicas (6 m)		
		Hipoacusia n (%)	OR (IC95%)	p	Alt. Neuro n (%)	OR (IC95%)	p
No	Negativa	12/49 (24,5%)	0,5 (0,06-4,7)	1,0	3/51 (5,9%)	2,7(0,24-29,9)	0,4
	Positiva	1/7 (14,3%)			1/7 (14,3%)		
Si	Negativa	11/28 (39,3%)	13,9 (1,5-125,6)	0,009	6/21 (19,4%)	4,2 (0,9-19,2)	0,098
	Positiva	9/10 (90%)			5/10 (50%)		
Total		n=94			n=89		

Tabla 46. Riesgo de desarrollo de hipoacusia y alteraciones neurológicas a los 6 meses de edad, en función del resultado de la PCR en líquido cefalorraquídeo, estratificado por la presencia de alteraciones en la ecografía neonatal.

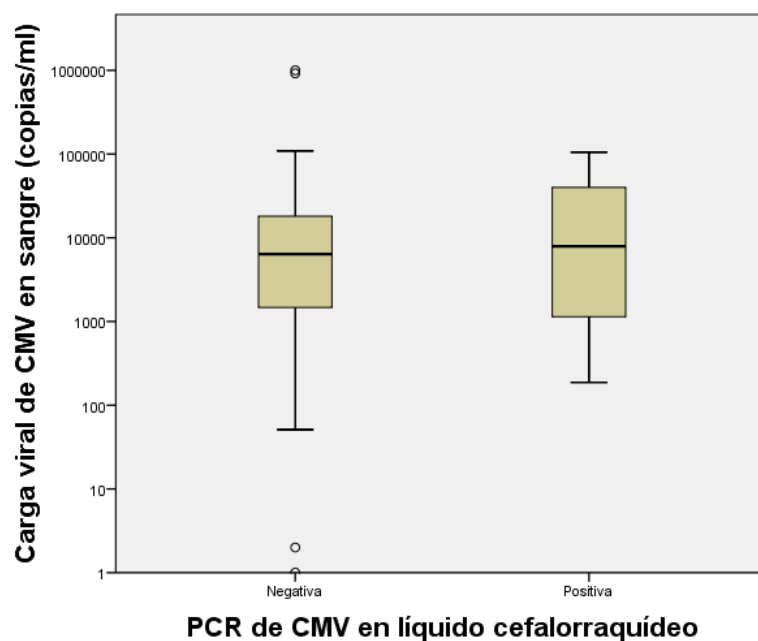


Figura 26. Carga viral de CMV en sangre en función del resultado de la PCR CMV del líquido cefalorraquídeo. ($p=0,6$)

Para estudiar si el hallazgo de una PCR positiva en LCR puede estar relacionado o no con la presencia de hematíes en el LCR, se recogió esta variable. Disponemos de esta información en 60 niños, con una mediana de hematíes de 31,5 RIQ [0-186,8]. Al comparar las medianas de hematíes en LCR de los grupos con PCR positiva y negativa, no se encontraron diferencias significativas ($p=0,4$). Comparando la proporción de niños con más de 400 hematíes/ μ L en LCR, las diferencias entre los niños con punción lumbar positiva y negativa tampoco fueron significativas (33% frente a 18% respectivamente; $p=0,4$).

Hay 6 niños asintomáticos al nacer con PCR positiva en el LCR, todos recibieron tratamiento antiviral postnatal por este resultado. Disponemos de los seguimientos de 3 de estos niños, ninguno de ellos presentó hipoacusia ni alteraciones neurológicas a los 6 meses de edad.

7.6 Relación entre la presencia de vasculopatía lenticuloestriada en la ecografía neonatal y el desarrollo de hipoacusia y alteraciones neurológicas.

Para estudiar la relación entre la existencia de la vasculopatía lenticuloestriada y las secuelas neurosensoriales, se realiza un análisis estratificado por la presencia o no de otras alteraciones en la ecográficas neonatal (tabla 47). Los niños en los que el único hallazgo ecográfico fue la VLE no mostraban un mayor riesgo de hipoacusia ($OR = 0,3$ ($0,04-2,7$); $p=0,4$) ni de alteraciones neurológicas a los 12 meses ($OR = 0,8$ ($0,7-0,9$); $p= 0,2$) (tabla 47). En los niños con otras alteraciones ecográficas, la presencia de VLE se asoció a un mayor riesgo de hipoacusia a los 12 meses de edad ($OR = 8$ ($1,5-41,5$); $p=0,001$).

Estudiamos la posible relación entre VLE y el desarrollo de secuelas neurosensoriales entre los niños asintomáticos. Realizamos un análisis estratificado en función de si han recibido tratamiento antiviral o no al nacer (tabla 48). Los dos niños asintomáticos con VLE que no reciben tratamiento antiviral no presentaron hipoacusia o alteraciones neurológicas. Entre los 6

niños asintomáticos con VLE que reciben tratamiento antiviral sólo 1 niño tuvo hipoacusia y ninguno presentó alteraciones neurológicas a los 12 meses. En los niños asintomáticos al nacer, la presencia de VLE aislada en la ecografía no se asoció a un mayor riesgo de hipoacusia o de alteraciones neurológicas.

Otras alteraciones en ecografía neonatal	VLE	Hipoacusia (12 m)			Alteraciones neurológicas (12 m)		
		Hipoacusia n (%)	OR (IC95%)	p	Alt. Neuro n (%)	OR (IC95%)	p
No	Sí	1/8 (12,5%)	0,3 (0,04-2,7)	0,4	0/8 (0%)	0,8 (0,7-0,9)	0,2
	No	26/83 (31,3%)			16/89 (18%)		
Sí	Sí	14/16 (87,5%)	8(1,5-41,5)	0,01	10/20 (50%)	1,5 (0,5-4,5)	0,4
	No	14/30 (46,7%)			13/32 (40,6)		
Total		n=137			n=149		

Tabla 47. Asociación entre la presencia de hipoacusia y alteraciones neurológicas a los 12 meses y el hallazgo de una vasculopatía lenticuloestriada (VLE) en la ecografía neonatal. Se ha analizado esta asociación de manera estratificada en función de la presencia o no de otras alteraciones en la ecografía neonatal.

Tratamiento antiviral	VLE	Hipoacusia (12 m)			Alteraciones neurológicas (12 m)		
		Hipoacusia n (%)	OR (IC95%)	p	Alt. Neuro n (%)	OR (IC95%)	p
No (n=29)	Sí	0/2 (0%)	0,8(0,6-0,9)	1,0	0/2 (0%)	0,97 (0,89-1,0)	1,0
	No	6/27 (22,2%)			1/27 (3,7%)		
Sí (n=25)	Sí	1/6 (16,7%)	0,6 (0,05-6)	1,0	0/6 (0%)	0,8 (0,7-1,0)	0,5
	No	5/19 (26,3%)			3/19(15,8%)		
Total		n=54			n=54		

Tabla 48. Asociación entre la presencia de hipoacusia y alteraciones neurológicas a los 12 meses y el hallazgo de una vasculopatía lenticuloestriada (VLE) en la ecografía neonatal. Se ha analizado esta asociación de manera estratificada en función de si han recibido tratamiento antiviral postnatal o no.

8. DISCUSIÓN

8 DISCUSIÓN

8.1 Factores de riesgo prenatales

Tanto la presencia de alteraciones en las ecografías neonatales como el momento de la infección fetal son los factores de riesgo prenatales más importantes asociados al desarrollo de secuelas a largo plazo.

8.1.1 Pruebas de imagen fetales

En el estudio, sólo la mitad de los niños con un CMVc confirmado tenían alteraciones en la ecografía fetal durante la gestación. Guerra *et al* también encontraron una baja sensibilidad (15%) de la ecografía fetal en la identificación de la infección congénita⁶¹. Las ecografías fetales rutinarias no pueden utilizarse de manera aislada como prueba de cribado de esta infección congénita, pues la mayor parte de los fetos infectados no tendrán alteraciones.

La sensibilidad de la ecografía fetal es baja para detectar los niños que manifestarán alteraciones del SNC al nacimiento. En el segundo trimestre, sólo 1 de cada 4 niños con afectación en la RMN al nacimiento tendrá alteraciones en la ecografía. Este porcentaje aumenta a un 70% en el tercer trimestre. Benoist *et al* publicaron una sensibilidad de la ecografía fetal del 85,7% para la detección de lesiones del SNC confirmadas por la autopsia fetal o al nacimiento mediante ecografía ⁶². En el estudio de Benoist, los pacientes eran referidos a una unidad especializada cuando se producía una seroconversión materna o cuando el feto tenía alteraciones compatibles con una infección por CMV, por lo que esta

selección de pacientes puede sesgar los resultados, mostrando una mayor sensibilidad. Por otro lado, mientras en el estudio de Benoist se comparaba la ecografía fetal con la ecografía al nacer, en nuestro caso la prueba de referencia ha sido la RMN postnatal y este factor también puede modificar los resultados. Guerra *et al* han estudiado la relación entre las ecografías fetales y la presencia de síntomas al nacer. Entre los pacientes con alteraciones de la ecografía fetal, el riesgo de síntomas al nacer es muy elevado; sin embargo, el hecho de no tener afectación ecográfica fetal no descarta la posibilidad de una infección sintomática⁶¹. Enders *et al* encontraron alteraciones solamente en 2 de los 17 fetos (11,8%) con una infección sintomática al nacer⁵⁸. En nuestro estudio, 2 de cada 3 fetos con una ecografía normal mostraron alteraciones en la RMN neonatal. Estos datos confirman que una ecografía normal en el segundo trimestre no descarta la posibilidad de afectación del SNC al nacer, y este hecho es de suma importancia cuando se informa a la gestante del pronóstico a largo plazo^{54,57-61}. El hallazgo ecográfico más frecuente es el retraso del crecimiento intrauterino, especialmente en el tercer trimestre. Este hallazgo (junto a la ascitis) también es el más frecuentemente observado en el estudio de Enders *et al*⁵⁸.

Para intentar mejorar los resultados de la ecografía fetal, se ha desarrollado en los últimos años la resonancia magnética fetal^{60,62}. En nuestra muestra se realizaron 29 resonancias fetales y en 17 casos disponemos también de los resultados de la resonancia al nacimiento. Aunque la sensibilidad de la RMN

fetal es mejor que la ecografía, llama la atención que entre los 5 casos con RMN fetales normales, hubo 3 niños con alteraciones en la RMN neonatal (60%). Sin embargo, muchos de los hallazgos fetales que se encuentran con la RMN pueden ser difíciles de interpretar y la experiencia con esta técnica es aún limitada^{59,62}. Farkas *et al* no encontraron diferencias significativas en el desarrollo neurocognitivo de los niños con una ecografía fetal normal, independientemente de que presentaran o no alteraciones en la resonancia fetal⁵⁹. El significado de las alteraciones menores en la sustancia blanca en las resonancias fetales tiene un valor pronóstico limitado y debe interpretarse con cautela si no hay otras alteraciones ecográficas⁵⁹. Picone *et al* ven la principal indicación de la RMN fetal en aquellos casos que sólo presentan alteraciones ecográficas fuera del SNC. En estos casos, podría aportar una mayor sensibilidad que la ecografía en la detección de lesiones parenquimatosas.

8.1.2 Edad gestacional en el momento de la infección

La edad gestacional en la que se produce la infección fetal ha sido considerada uno de los factores más relevantes que determinan el riesgo de secuelas^{34,35,56}. Sin embargo, hay un porcentaje de fetos infectados en el primer y segundo trimestre que no presentan síntomas tras el nacimiento, por lo que es necesario determinar cuál es el papel real de esta variable en el pronóstico a largo plazo. Hemos encontrado que la edad gestacional en el momento de la infección

materna, de los niños con secuelas (hipoacusia y/o alteraciones neurológicas) a los 6 meses es significativamente menor que la de los niños sin secuelas.

Cuando introducimos tanto la presencia de alteraciones ecográficas fetales, como el momento de la infección materna en el modelo de regresión, la presencia de alteraciones en las pruebas de imagen sigue siendo un factor de riesgo independiente de hipoacusia (OR: 9,9 (1,5-65,9); $p=0,017$) y de alteraciones neurológicas (OR=61,5 (4,7-802,4) $p=0,002$) a los 12 meses. Stagno *et al* estudiaron la influencia del momento de la infección fetal en la presencia de síntomas al nacer y todos los niños sintomáticos se habían infectado antes de la semana 27 de gestación³⁵. Zavattoni *et al* también encontraron una menor afectación entre los niños infectados en el tercer trimestre⁵⁶ y en otro estudio confirmaron el alto riesgo de presentar síntomas cuando la infección se produce en el periodo periconcepcional o en el primer trimestre¹³⁵.

Nuestros hallazgos confirman que los fetos infectados de manera precoz tienen un mayor riesgo de secuelas, sin embargo la presencia de alteraciones en la ecografía fetal es el factor de riesgo más determinante de desarrollo de secuelas.

8.1.3 Administración de inmunoglobulinas

La administración de inmunoglobulina hiperinmune durante la gestación se ha propuesto como profilaxis y tratamiento de la infección fetal por CMV. Hay pocos estudios correctamente realizados sobre la utilidad real de este tratamiento. Nigro *et al*¹⁰⁹ realizaron un estudio no aleatorizado que concluía

que tanto la profilaxis como el tratamiento con HIG podrían ser eficaces en la infección congénita por CMV. Estos hallazgos coincidían con los encontrados en otros estudios posteriores; sin embargo, la falta de ensayos clínicos aleatorizados no permitía confirmar la indicación de este tratamiento^{110,111,136}. La utilización de la HIG en España no está generalizada y entre los centros participantes del registro sólo se utiliza en unos pocos hospitales. Por otro lado, la falta de cribado serológico durante la gestación en nuestro medio limita la posibilidad del uso de esta medicación y en nuestra muestra sólo se utilizó en el 8% de los fetos infectados.

Revello *et al* han publicado el primer estudio aleatorizado sobre la utilidad de la HIG como profilaxis de la infección fetal. Encontraron un descenso de la prevalencia de la infección congénita de un 14%, pero estas diferencias no fueron significativas ($p=0,13$) y no encontraron tampoco una menor frecuencia de niños sintomáticos¹¹². Sin embargo, no se evaluó la presencia de secuelas a largo plazo, ni de su utilidad como tratamiento en los fetos con una infección confirmada mediante amniocentesis. En nuestro estudio, la administración de HIG no se asoció a cambios significativos en el pronóstico en cuanto a secuelas. En España se desconoce el número total de gestantes que han sido tratadas con HIG (solo se incluyen en el registro los niños infectados) por lo que no se pueden sacar conclusiones en cuanto a su utilidad profiláctica. El diseño del estudio tampoco permite conocer la utilidad de la HIG como tratamiento de los

fetos infectados, por lo que es necesario que se realicen nuevos estudios sobre esta posible indicación.

8.2 Factores de riesgo neonatales para el desarrollo de hipoacusia

8.2.1 La esplenomegalia y la hipoacusia al nacimiento son factores de riesgo de hipoacusia a largo plazo

En el presente estudio, las variables que se asociaron de manera independiente a la existencia de hipoacusia en el seguimiento fueron la esplenomegalia y la hipoacusia al nacimiento. Aunque tres de cada 4 niños con esplenomegalia al nacimiento van a presentar hipoacusia, la asociación entre estas dos variables sólo se pudo confirmar a los 6 meses de edad. La pérdida de sujetos en la visita de los 12 meses puede haber tenido un papel relevante en este sentido. Aunque en el análisis univariado la presencia de trombopenia, esplenomegalia, alteraciones en la ecografía cerebral y la hipoacusia al nacer se asociaron significativamente con presentar hipoacusia en el seguimiento, el análisis multivariante no encontró asociación con la trombopenia ni con la afectación del SNC. En diversos estudios, se ha puesto de manifiesto una asociación entre la presencia de una afectación sistémica y el desarrollo de hipoacusia^{115,122,137}. Rivera *et al* encontraron que la presencia de bajo peso para la edad gestacional y las petequias se asociaban de manera independiente al desarrollo de hipoacusia¹¹⁵. Sin embargo, la presencia de esplenomegalia no se asociaba a la hipoacusia en el análisis multivariante. En el estudio de Rivera, todos los

pacientes incluidos eran sintomáticos al nacer y esto podría explicar las diferencias que encontramos con nuestros datos.

8.2.2 Las alteraciones ecográficas neonatales no se asocian a un mayor riesgo de hipoacusia

La presencia de alteraciones en la ecografía neonatal se asoció en el análisis univariado con el desarrollo de hipoacusia, pero al introducir la esplenomegalia, la trombopenia y la hipoacusia al nacimiento en el modelo multivariante, no se encontró una asociación significativa. En torno al 40% de los niños con alteraciones en la ecografía al nacimiento no van a presentar hipoacusia a los 6 y 12 meses. Rivera *et al* tampoco encontraron asociación clara entre el desarrollo de hipoacusia y la presencia de afectación del SNC al nacimiento (microcefalia o convulsiones)¹¹⁵. En nuestro estudio la presencia de microcefalia no se asoció con el desarrollo de hipoacusia a largo plazo, ni siquiera ajustando la microcefalia por el peso. Diversos estudios han revelado que el desarrollo de la hipoacusia se produce principalmente por una alteración de las células de la estría vascular, con modificación del potencial eléctrico de la endolinfa que impide un correcto funcionamiento del Órgano de Corti^{44,45}. También se produce la pérdida de neuronas a nivel del ganglio espiral y un proceso inflamatorio a nivel coclear⁴⁵. Otro de los mecanismos propuestos de hipoacusia en el CMV son las alteraciones cromosómicas que el virus puede ocasionar a través de roturas, condensación prematura de la cromatina y

lesiones estructurales del centrosoma^{138,139}. El CMV es capaz de producir alteraciones genéticas en la región 1q23.3 que se encuentra situada entre dos loci relacionados con la sordera, como son DFNA49 y DFNA7^{138,139}. No se ha podido confirmar que la inducción de mutaciones de GJB2 sea otro de los mecanismos de hipoacusia presentes en el CMVc¹³⁸. Es posible que los diferentes mecanismos patogénicos de la infección congénita por CMV a en el aparato auditivo y en el SNC expliquen en parte que no exista una fuerte asociación de la hipoacusia con la ecografía.

Uno de cada 3 niños con una infección sintomática al nacimiento presentarán hipoacusia, frente al 10-12 % de los niños asintomáticos^{71,72}. De los niños sintomáticos con hipoacusia, en un 18% de los casos se manifestará de forma tardía y uno de cada 6 presentará una pérdida progresiva de la audición⁷¹. Los niños sintomáticos tienen más riesgo de presentar afectación del SNC y, por lo tanto, siempre se ha asumido que tienen más riesgo hipoacusia. Sin embargo, según los datos publicados por Rivera *et al*¹¹⁵ y nuestros propios datos, parece que los mecanismos del daño cerebral y de la hipoacusia podrían discurrir por vías distintas. En un estudio recientemente publicado por nuestro grupo, se encontró que el genotipo gB2 se asociaba a un mayor riesgo de afectación neurológica que otros genotipos. Sin embargo, esta asociación no se encontró con la hipoacusia, por lo que una hipótesis es que algunos genotipos ocasionen preferentemente afectación neurológica, mientras que otros se asocian más a secuelas auditivas¹⁴⁰.

8.2.3 La hipoacusia al nacimiento es el factor de riesgo de secuelas auditivas a largo plazo.

Aunque la hipoacusia pueda presentarse de manera tardía, es lógico pensar que los niños con hipoacusia al nacimiento tendrán un mayor riesgo de sordera a largo plazo. Los datos obtenidos en el estudio refuerzan este planteamiento y, de hecho, es el predictor más importante de sordera a largo plazo. El tratamiento antiviral postnatal frena la progresión de la hipoacusia, pero es poco frecuente que consiga revertir completamente una pérdida auditiva establecida^{101,103,141}.

8.2.4 Carga viral

Otro de los aspectos que más se ha intentado relacionar con el desarrollo de hipoacusia en el CMVc es la carga viral en los distintos fluidos corporales^{45,71,120-122,142}. En nuestro estudio, no hemos encontrado diferencias significativas entre la carga viral en sangre de los niños con y sin hipoacusia a los 6 y 12 meses de edad. Al realizar la curva ROC para evaluar la capacidad predictiva de la carga viral para en el desarrollo de hipoacusia, el AUC era bajo 0,5 (IC95%: 0,4-0,7). Boppana *et al* encontraron que los niños con hipoacusia presentaban mayores cargas virales en sangre¹²². Sin embargo, cuando comparaba a los niños con y sin hipoacusia que tenían otros síntomas al nacer no se encontraban diferencias en la carga viral en sangre ni en orina¹²². Los niños del estudio de Boppana *et al* se diagnosticaron mediante el cribado sistemático de CMVc al nacer, por lo que

la mayor parte eran niños asintomáticos¹²². En nuestro medio no se realiza cribado sistemático de CMVc en recién nacidos, por lo que el porcentaje de niños sintomáticos incluidos es mucho mayor que en el estudio de Boppana ¹²². Este hecho podría ser el motivo de la baja capacidad pronóstica de la carga viral en sangre que hemos encontrado. Otro estudio realizado por Ross *et al* encontró un bajo valor predictivo de la carga viral en sangre en relación con el desarrollo de hipoacusia, aunque apunta que cargas virales bajas (< 3500 copias/mL) en niños asintomáticos se asocian a un bajo riesgo de hipoacusia¹²¹. Rivera *et al* tampoco encontraron diferencias significativas en la carga viral en orina entre los niños con y sin hipoacusia en el seguimiento ¹¹⁵. Bradford *et al* no encontraron diferencias significativas en la audición entre diferentes rangos de viremia, pero los niños con viremia indetectable al nacer tenían un bajo riesgo de hipoacusia a largo plazo¹²⁰. En nuestro estudio tampoco se encontró una asociación entre la presencia de viremia detectable al nacimiento y el riesgo de desarrollo de hipoacusia, sin embargo es posible que la presencia de un mayor porcentaje de niños sintomáticos al nacer que en otros estudios distorsione estos resultados.

Como resumen, se puede concluir que en la mayoría de los trabajos el valor predictivo positivo de cargas virales elevadas es pequeño(30-80%) sin embargo el valor predictivo negativo de las cargas virales bajas en relación con la hipoacusia es mejor (50-100%) , especialmente si el niño está asintomático¹⁰⁰. Es decir, un niño asintomático con una carga viral en sangre baja al nacimiento

tiene poco riesgo de hipoacusia, pero no todos los niños con cargas virales altas desarrollarán una sordera.

8.3 Factores de riesgo neonatales y el desarrollo de secuelas neurológicas

8.3.1 Microcefalia

Existen pocos estudios que evalúen los factores pronósticos al nacimiento de secuelas neurológicas en los niños con CMVc. Uno de los hallazgos que más se han estudiado es la presencia de microcefalia al nacer, aunque los resultados han sido contradictorios. Noyola *et al* encontraron que la presencia de microcefalia, ajustada por el peso y la edad gestacional, era un marcador específico (aunque poco sensible) de desarrollo de alteraciones cognitivas y motoras²². En nuestro estudio, hemos utilizado el Z score del perímetro craneal ajustado por sexo y por edad gestacional y no hemos encontrado asociación con el desarrollo de alteraciones neurológicas. Hemos usado también la definición de "microcefalia ajustada al peso" propuesta por Noyola *et al* ²² y tampoco hemos encontrado una asociación significativa con las secuelas. Estas diferencias entre los resultados podrían explicarse porque en el estudio de Noyola todos los niños incluidos presentaron síntomas al nacer, y más del 75% presentaban alteraciones en el TAC craneal, mientras que en nuestro estudio el porcentaje de sintomáticos era menor y sólo el 7,8% presentaban microcefalia al nacer ²². La mejora de las técnicas de diagnóstico prenatal hace que se detecten muchos de los casos más graves y en bastantes ocasiones la gestante opta por la

interrupción del embarazo. Por lo tanto, actualmente no es habitual que los neonatos con CMVc presenten graves alteraciones neurológicas (microcefalia o hidrocefalia severa). Alarcón *et al* coinciden con Noyola que la microcefalia ajustada por el peso es un marcador muy específico, pero poco sensible (44%) de secuelas a largo plazo⁷⁷. Ramsay *et al* publicaron que los niños con microcefalia tenían un riesgo mayor de secuelas que los niños que sólo tenían afectación del sistema retículoendotelial (SRE)⁶⁹. Conboy *et al* refieren que la microcefalia sí se asocia a un peor pronóstico, pero que es la presencia de coriorretinitis la que más se asocia a las secuelas neurológicas⁶⁵. Al igual que en nuestro estudio, Pass *et al* no encontraron un mayor riesgo de secuelas neurológicas entre los niños sintomáticos en función de la presencia o no de microcefalia o de hiperproteínorraquia al nacer⁶⁸. Las diferencias entre todos estos estudios pueden deberse a la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas, especialmente en el porcentaje de niños sintomáticos y la gravedad de los hallazgos al nacimiento. Mientras que muchos estudios antiguos solo incluyen niños diagnosticados por la presencia de una afectación neonatal importante, en otros estudios los niños se han diagnosticado mediante un cribado poblacional de CMVc. Son los estudios más antiguos los que encuentran una mayor asociación entre la microcefalia y las alteraciones neurológicas, probablemente en relación con un mayor porcentaje de sintomáticos y de casos más graves que los que diagnosticamos actualmente. En todo caso no está de más destacar que muchos CMVc sin secuelas a largo plazo

van a tener un bajo peso y un bajo perímetro craneal al nacimiento. Es necesario al evaluar la presencia de microcefalia al nacer que ajustemos el z score del perímetro craneal por el peso del niño.

8.3.2 Elevación de la GPT

Al igual que ocurre con la hipoacusia, los niños con síntomas al nacimiento tienen un riesgo mayor de alteraciones neurológicas en el seguimiento^{65,68,69}. La afectación del SRE es un hallazgo frecuente entre los neonatos sintomáticos y se manifiesta en forma de hepatoesplenomegalia (60%), con ictericia (67%) y petequias (76%)⁶³. Se produce un cuadro de hepatitis con elevación de transaminasas e hiperbilirrubinemia directa⁶³. No es infrecuente una colangitis con infección de las células ductales biliares, una colestasis intralobular y también una colestasis secundaria a la hematopoyesis extramedular⁴. Aunque los trabajos clásicos describen un alto porcentaje de afectación hepática entre los neonatos sintomáticos^{63,64,68}, la presencia de elevación de la GPT (>80 UI/L) o de colestasis no es tan habitual en los últimos años¹⁴³. En el estudio de Bilavsky *et al* se encontró afectación hepática (con elevación de transaminasas o colestasis) en un 6,6% de los niños sintomáticos y, al igual que en nuestro estudio, un elevado porcentaje de estos niños sufrieron afectación del SNC¹⁴³. En nuestra muestra, hasta el 75% de los niños con elevación de la GPT (>80 UI/L) van a desarrollar alteraciones neurológicas a largo plazo y es la variable predictora con mayor peso en el análisis multivariante, junto a la hipoacusia al nacer.

8.3.3 Hipoacusia al nacimiento

La hipoacusia al nacimiento es un factor de riesgo independientemente asociado al desarrollo de secuelas neurológicas en nuestra población. Uno de cada 2 niños con hipoacusia al nacimiento desarrollará secuelas neurológicas a largo plazo. Aunque como se ha comentado, el daño neurológico y la hipoacusia no siempre se presentan juntos, el hecho de tener una sordera al nacimiento es más frecuente entre los pacientes con una afectación sistémica más grave. Por lo tanto, es lógico que el riesgo de secuelas sea mayor en estos niños. Es necesario realizar un seguimiento neurológico estrecho entre los niños con hipoacusia al nacimiento, para intentar detectar de manera precoz la presencia de alteraciones neurocognitivas. Estos niños podrían beneficiarse de un tratamiento rehabilitador temprano, que mejore el pronóstico neurológico a largo plazo.

8.3.4 Pruebas de imagen

Uno de los resultados más relevantes del estudio es el limitado valor pronóstico de los hallazgos ecográficos al nacimiento en el desarrollo de secuelas neurológicas. Aunque en el análisis univariado se asociaba a alteraciones neurológicas a los 6 y 12 meses, estos hallazgos no se mantenían en el modelo multivariante. En el presente estudio hasta un 60% de los niños con alteraciones ecográficas no van a desarrollar secuelas neurológicas en los primeros 12 meses de vida. La ecografía neonatal se ha considerado un factor

pronóstico de secuelas neurológicas a largo plazo, sin embargo los estudios son aún muy limitados^{77,116,144,145}. Ancora *et al* encontraron una buena correlación entre la presencia de alteraciones en la ecografía neonatal y el desarrollo de secuelas. Sin embargo, otros autores defienden que un porcentaje no despreciable de recién nacidos con una ecografía normal presentan alteraciones en la resonancia magnética craneal, e incluso llegan a desarrollar secuelas neurológicas a largo plazo^{80,117}. Capretti *et al* realizaron ecografías y RMN a neonatos con CMVc y encontraron que el 7,5% de los niños con una ecografía normal tenían una RMN alterada¹¹⁷. Estos niños manifestaron hipoacusia o alteraciones neurocognitivas a largo plazo¹¹⁷. En nuestro estudio, un 35% de los niños con una ecografía neonatal normal presentaban alteraciones de la RMN, principalmente de la sustancia blanca y de la migración neuronal. En nuestra muestra un 75% de los niños con una ecografía normal y una RMN alterada presentan hipoacusia y un 25% alteraciones neurológicas a los 12 meses de vida. Estos niños tienen principalmente alteraciones de la sustancia blanca que no pudieron detectarse en la ecografía neonatal y 2 de cada 3 presentaron un exploración física normal al nacer. Es posible que muchos de los niños que habitualmente son clasificados como “asintomáticos” tengan este tipo de alteraciones en sustancia blanca.

Al pasar desapercibidos dichos hallazgos no se beneficiarían del tratamiento antiviral, que podría reducir el riesgo de secuelas posteriores. Por este motivo, algunos autores recomiendan realizar de manera rutinaria una RMN en el

periodo neonatal a todos los niños con CMVc, y nuestros datos refuerzan esta indicación^{80,117,145,146}. En nuestro centro, se ha desarrollado una técnica para realizar RMN craneales a neonatos sin precisar sedación. Se utiliza una técnica de contención mecánica con un colchón neumático, aislamiento auditivo con orejeras y alimentación previa a la prueba, con una tasa de éxitos muy elevada, y sin presentar complicaciones relevantes¹¹⁸. Dado que es posible realizar la prueba sin sedación y al no ser una técnica radiante, hace recomendable incluir la RMN en la evaluación rutinaria de todo niños con CMVc. Los estudios clásicos sobre el papel pronóstico de las pruebas de imagen en el CMVc se han realizado principalmente con el TAC craneal. Noyola *et al* publicaron una alta sensibilidad del TAC para predecir la ocurrencia de secuelas neurológicas (retraso mental o alteraciones motoras) en los CMVc²². Sin embargo, la dosis radiante es considerable, por lo que actualmente apenas se usa en el CMVc si existe la posibilidad de realizar una RMN. Por otro lado, tiene una capacidad limitada para valorar las alteraciones de la sustancia blanca, las alteraciones de la migración, la polimicrogiria, las displasias hipocampales y las alteraciones cerebelosas, y esta es otra razón para recomendar el uso de la RMN¹⁴⁵.

En nuestro estudio hay un pequeño porcentaje (10%) de pacientes con alteraciones ecográficas pero con una RMN normal. La mayor parte de estos niños tienen calcificaciones intracraneales en la ecografía y se sabe que la RMN tiene una menor capacidad para detectar estas lesiones^{117,145,146}. Las calcificaciones intracraneales se han relacionado con un peor pronóstico a largo

plazo, por lo que es importante conocer su existencia. Por tanto, parece apropiado mantener la ecografía transfontanelar dentro del primer escalón diagnóstico de la infección neonatal ^{22,145}. Creemos que sería deseable pasar del clásico "*modelo de síntomas*" (sintomático frente a asintomático) a un "*modelo de riesgos*" (alto riesgo de secuelas frente a bajo riesgo de secuelas), y decidir la actitud terapéutica en cada paciente en función del riesgo de secuelas.

8.4 Modelo pronóstico de hipoacusia

La posibilidad de elaborar un modelo pronóstico del riesgo de secuelas auditivas resulta de gran utilidad a la hora de decidir el mejor tratamiento y seguimiento posibles en los recién nacidos con CMVc. El mejor modelo predictivo posible incluyó la presencia de hipoacusia al nacimiento, la esplenomegalia y el valor de la GPT al nacer. Este modelo presenta una elevada área bajo la curva (la AUC es de 0,9 (IC95%: 0,83-0,97)), es decir, tiene un elevado poder predictivo para clasificar correctamente a los pacientes en función del riesgo de desarrollo de hipoacusia. Un niño sin hipoacusia ni esplenomegalia al nacer y con un valor normal de GPT tiene un riesgo de desarrollar hipoacusia en el primer año de vida de un 13%. Este riesgo de desarrollo de hipoacusia es similar a lo publicado en otras series para pacientes asintomáticos (10-12%) ^{71,72}. Dado que el tratamiento antiviral ha demostrado que limita la progresión de la hipoacusia y mejora el pronóstico neurológico se debe administrar a todos los niños con sordera al nacimiento. Existen dudas

sobre si debe administrarse a los niños que tienen solo síntomas diferentes de la hipoacusia y las alteraciones neurológicas. El único ensayo clínico que comparaba el tratamiento antiviral frente a placebo solo incluyó a niños con alteraciones del SNC o hipoacusia, por lo que no se conoce el papel de los antivirales en niños con otros síntomas. Nuestro estudio revela que la presencia de esplenomegalia multiplica el riesgo de hipoacusia. Un niño sin elevación de las transaminasas y sin sordera al nacer pero con esplenomegalia pasa de un 13% de probabilidad de hipoacusia a casi un 50%. En estos casos en los que el riesgo de desarrollo de hipoacusia es elevado parece recomendable administrar tratamiento antiviral, aunque no exista afectación del SNC o sordera al nacimiento.

8.5 Modelo pronóstico de alteraciones neurológicas

El modelo pronóstico de desarrollo de alteraciones neurológicas a los 12 meses de edad incluye la presencia de hipoacusia al nacer, la presencia de alteraciones en las pruebas de imagen neonatal y la elevación de las transaminasas (GPT) . El AUC del modelo es elevada (0,88 (IC95%: 0,8-0,96), por lo que tiene un elevado poder predictivo del riesgo de secuelas neurológicas y puede ser utilizado en aquellos casos en los que tengamos dudas de iniciar o no el tratamiento antiviral. Este modelo pronóstico establece que el riesgo de desarrollo de secuelas neurológicas a los 12 meses en un niño sin hipoacusia o alteraciones de las pruebas de imagen fetales y con una GPT normal es de un

10%. En otros estudios el riesgo de secuelas neurológicas entre los niños asintomáticos oscila entre el 4 y el 7,6 ^{72,147-150}. La presencia de un mayor porcentaje de secuelas neurológicas puede deberse a que los pacientes no proceden del cribado neonatal y hay un mayor número de niños sintomáticos al nacer que en otros estudios. Por otro lado, algunos pacientes sin alteraciones en la ecografía ni hipoacusia al nacer, ni elevación de transaminasas, podrían presentar algún otro síntoma y no ser niños completamente asintomáticos como en los estudios citados previamente.

8.6 Relación entre el resultado de la PCR en el LCR y el desarrollo de hipoacusia y alteraciones neurológicas

Un resultado positivo de la PCR en el LCR se ha relacionado clásicamente con un aumento del riesgo de secuelas a largo plazo, y en algunas guías clínicas se recomienda el tratamiento de estos pacientes ^{77,79,131,132}. No obstante, los estudios citados están realizados con un número tan limitado de pacientes que resulta difícil sacar conclusiones ^{77,131,132}. Atkins *et al* incluyeron a 13 niños con CMVc (10 con una infección congénita sintomática por CMV, un niño con un CMVc no confirmado y 2 niños asintomáticos) y a 100 controles¹³¹. De los 13 niños con CMVc, siguieron a 7 niños con los siguientes resultados: los 5 niños con PCR positiva en LCR presentaron alteraciones del neurodesarrollo y los 2 con PCR negativas no tuvieron secuelas¹³¹. Los autores asociaron la presencia de la PCR positiva a un peor pronóstico, sin embargo el diseño del estudio, las pérdidas

en el seguimiento y el limitado número de pacientes incluidos no permiten generalizar estos resultados¹³¹. Halwachs *et al* estudiaron la PCR en LCR de 27 niños y los 8 niños con una PCR positiva presentaban síntomas al nacer¹³². Sin embargo, 6 niños del grupo de sintomáticos al nacer presentaban una PCR negativa en el LCR y niños asintomáticos con PCR negativa desarrollaron síntomas tras el nacimiento¹³². En dicho estudio ninguno de los niños con PCR en LCR tuvo cargas virales mayores de 400 copias/mL y no describen la asociación de la PCR con las secuelas a largo plazo¹³². En el estudio realizado por Alarcón *et al* se realizó una punción lumbar a 13/29 niños con un CMVc sintomático y sólo en un caso resultó positiva. Aunque no pudieron establecer una asociación clara del resultado de la PCR con el pronóstico, la $\beta 2$ microglobulina y las proteínas en el LCR si eran factores predictores de secuelas⁷⁷. No existe una clara evidencia para recomendar la realización rutinaria de una punción lumbar a todos los niños con CMVc y las recomendaciones en las diferentes guías clínicas es bastante discordante

^{79,81,104,105}.

En nuestro estudio, se realizó una punción lumbar y estudio de PCR en LCR en 142 niños, siendo el estudio con un mayor número de pacientes de los publicados hasta la fecha. Cuando analizamos el desarrollo de hipoacusia y de alteraciones neurológicas en los primeros 6 meses de vida, sólo encontramos asociación entre la PCR positiva con el desarrollo de hipoacusia en el grupo de los niños con afectación ecográfica del SNC. Es decir, que al igual que en otros

estudios, los niños con afectación en el SNC con PCR positiva en LCR tienen un riesgo elevado de secuelas a largo plazo ^{77,131,132}. La OR para el desarrollo de hipoacusia en el grupo de niños con afectación del SNC fue de 13,9 (1,5-125,6) y para el desarrollo de alteraciones neurológicas fue de 4,9 (0,9-19,2).

La PCR resultó positiva en 6 niños asintomáticos y ninguno de los 3 niños que completaron el seguimiento desarrollaron secuelas. Pero es necesario destacar que los 6 recibieron tratamiento antiviral por el resultado de la PCR en el LCR y este hecho pudo contribuir a la ausencia de síntomas en el seguimiento. La presencia de una PCR positiva en sangre periférica se relaciona con una mayor posibilidad de que la PCR fuera también positiva en LCR. El pronóstico de los niños con una PCR negativa en sangre al nacer ha resultado mejor en diversos estudios, y es lógico que cargas virales más bajas se asocien a menos carga viral en LCR y a un mejor pronóstico neurológico y auditivo ^{98,99,121}. Cuando comparamos las cargas virales en sangre de los niños con PCR en LCR positiva y negativa no se encontraron diferencias significativas.

Un aspecto que puede condicionar el resultado es la presencia de hematíes en el LCR por una punción traumática. La posibilidad de que un resultado positivo de la PCR se deba a la presencia de hematíes por la propia punción lumbar complica la interpretación del resultado. Para poder conocer la influencia de la presencia de hematíes en el resultado se recogió el número de hematíes en la muestra de LCR. Al comparar las medianas entre los grupos con PCR positiva y con PCR negativa, no se encontraron diferencias significativas. Las

diferencias en cuanto al porcentaje de niños con más de 400 hematíes/ mm³ en LCR entre los dos grupos tampoco fue significativa, aunque el porcentaje fue mayor en el grupo de PCR positiva (33% frente a 18%). Aunque no queda claro la influencia de una punción lumbar traumática en el resultado de la PCR en el LCR, es lógico asumir que si existe un importante paso de sangre al LCR y la carga viral en sangre es elevada el riesgo de un falso positivo no debe desestimarse. Sin embargo, no sabemos a partir de qué número de hematíes en LCR debemos dudar un resultado positivo.

Como resumen, no queda claro que la presencia de una PCR positiva en LCR aumente claramente el riesgo de secuelas en los niños asintomáticos y, por otro lado, niños una PCR negativa pueden desarrollar secuelas. Ante todos estos datos concluimos que no se puede recomendar la realización rutinaria de una punción lumbar en niños con CMVc, especialmente entre los niños asintomáticos. En los niños con alguna alteración ecográfica y una PCR positiva en LCR se debe recomendar el tratamiento antiviral.

8.7 Relación entre la presencia de vasculopatía lenticuloestriada en la ecografía neonatal y desarrollo de hipoacusia y alteraciones neurológicas

La vasculopatía lenticuloestriada es un hallazgo ecográfico de aumento de la ecogenicidad de los vasos lenticuloestriados que derivan de la arteria cerebral

media y que irrigan los ganglios basales y zonas del tálamo^{78,133,134,151,152}. Se ha relacionado con infecciones congénitas (CMV, toxoplasma, sífilis, rubeola, rotavirus, meningitis y VIH) pero también con varias etiologías no infecciosas como, metabolopatías, hipoxia-isquemia, infartos isquémicos cerebrales, hemorragias intraventriculares, síndrome del alcohol fetal, lupus eritematoso, diabetes materna, cardiopatías congénitas, transfusión feto-fetal, hipotiroidismo congénito. También se ha visto que la VLE puede ser un hallazgo transitorio en niños pretérmino. Se cree que la calcificación de las arterias lenticuloestriadas se produce tras un daño endotelial por las diversas causas previamente expuestas. La prevalencia de VLE en neonatos sanos es baja (0-0,5%), aumentando la proporción hasta un 0,4-5,8% en niños con patologías de base, como prematuros o niños ingresados en unidades de cuidados intensivos^{133,152}. Sin embargo, no está claro el papel pronóstico de esta alteración cuando se presenta de manera aislada al nacimiento en niños sin otros síntomas. En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en cuanto al desarrollo de secuelas entre aquellos niños sin otras alteraciones de la ecografía neonatal. Entre aquellos niños con otras alteraciones de la ecografía neonatal, la presencia de VLE sí aumenta el riesgo de desarrollo de hipoacusia a los 12 meses (OR: 8(1,5-41,5)), desarrollando hipoacusia un 87,5% de los niños con VLE frente al 46,7% de los niños sin VLE. En este grupo no se pudo confirmar la asociación de la VLE con el desarrollo de alteraciones neurológicas a los 12 meses ($p=0,4$). Bilavsky *et al* realizaron un estudio retrospectivo donde

incluyeron a 89 niños con un CMVc sintomático y estudiaron la evolución auditiva de estos niños. Dividieron a estos niños en varios grupos. En un grupo estaban aquellos niños con VLE sin otras alteraciones ecográficas y sin hipoacusia que nacieron antes de 2006 y que no recibieron tratamiento. En un segundo grupo, aquellos niños con VLE sin otros hallazgos ecográficos ni hipoacusia que nacieron a partir de 2006 y que recibieron tratamiento antiviral. Decidieron administrar tratamiento antiviral a los niños con VLE desde el año 2006 por la alta tasa de desarrollo de hipoacusia que habían observado en el periodo previo^{78,133}. Al comparar ambos grupos los niños con VLE no tratados presentaban un 84,6% de progresión de la hipoacusia, frente a un 0% en el grupo de tratados ($p < 0,001$), por lo que concluyen recomendando el tratamiento de estos niños¹³³. Syuan *et al* encontraron también un alto porcentaje de secuelas entre los niños con CMVc y VLE, sin embargo 15 de los 20 niños tenían otras alteraciones cerebrales¹³⁴. Ninguno de los 5 niños con VLE aislada presentó hipoacusia o alteraciones neurocognitivas moderadas o severas y sólo uno de ellos recibió tratamiento antiviral¹³⁴.

En nuestro caso no encontramos un aumento del riesgo de hipoacusia en los niños con VLE sin otras alteraciones de la ecografía cerebral. Sin embargo, hay que destacar que de los 8 niños sin otras alteraciones salvo la VLE, 6 recibieron tratamiento antiviral por este motivo y este hecho podría explicarse el buen pronóstico. Ninguno de los otros dos niños restantes con VLE aislada que no recibieron tratamiento antiviral desarrollaron hipoacusia en el seguimiento.

Oosterom *et al* describieron los hallazgos en la ecografía cerebral de 20 niños ingresados en unidades de cuidados intensivos neonatales con diagnóstico de CMVc¹⁴⁶. Ninguno de los 10 niños sin otros síntomas y con alteraciones leves en la ecografía (VLE o quistes en matriz germinal) presentaron secuelas durante el seguimiento¹⁴⁶.

En nuestra muestra, se encontró VLE en un 20,4% de todos los niños y en un 34,4% de los niños sintomáticos, frente a un 72,2% entre los niños sintomáticos del estudio de Bilavsky *et al* y un 80% entre los niños incluidos en el estudio de Oosterom¹³³. Sin embargo, otros estudios presentan porcentajes de VLE en niños con CMVc que oscilan entre un 7,5% y un 35,7% más cercanos a nuestros datos^{117,134,145}. Los diferentes métodos de selección de pacientes y las distintas proporciones de niños sintomáticos entre los estudios pueden explicar las variaciones en los porcentajes de VLE encontrados^{117,133,134,145,146}.

Como conclusión, parece evidente que la presencia de VLE es relativamente frecuente en el CMVc, especialmente entre los niños sintomáticos, aunque no es un hallazgo patognomónico de esta infección congénita. La VLE en niños con otras alteraciones del SNC se asocia a un mayor riesgo de hipoacusia. No queda claro si su presencia en niños asintomáticos y sin otras alteraciones en las pruebas de imagen se asocia a un mayor riesgo de hipoacusia y de secuelas neurológicas, por lo que la indicación de tratamiento debe individualizarse en estos pacientes.

8.8 Características maternas y gestacionales

La mayor parte de las gestantes eran de origen español, seguidas de las gestantes de origen marroquí y rumano, con una distribución de nacionalidades muy similar a la de la población general en España¹⁵³. La incidencia de la infección congénita por CMV es más alta en familias de bajo nivel socioeconómico y en EEUU es más habitual en familias afroamericanas¹. A diferencia de otras infecciones de transmisión vertical como la sífilis congénita o el VIH que en España son más frecuentes entre población inmigrante ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶, en nuestro caso la mayor parte de las gestantes son de origen Español. Aunque tener otros hijos menores de 3 años, especialmente si acuden a guardería, es un factor de riesgo para tener una infección gestacional por CMV, en nuestra muestra sólo el 30% tenían hijos por debajo de esta edad. La infección gestacional por CMV es asintomática en un alto porcentaje de casos y en nuestra población sólo el 20% de las gestantes recuerdan algún síntoma compatible con la infección. En estudios prospectivos donde se realizan serologías periódicas frente a CMV durante la gestación y las madres están más alerta de posibles signos de infección, hasta un 70% de las madres refieren síntomas ¹¹.

8.8.1 Diagnóstico de la infección materna y fetal

En un 70% de los casos en los que disponemos de serologías gestacionales se produjo una primoinfección materna. En España la prevalencia de mujeres

seroinmunes en edad gestacional ronda el 70%, por lo que hasta un 30% serían susceptibles de presentar una primoinfección durante el embarazo ¹⁵. En los países de alta seroprevalencia, la mayor parte de los niños con CMVc se infectaron por reactivaciones o reinfecciones de madres inmunes ¹³. En nuestro medio, parece que un alto porcentaje de los casos de CMVc se debe a infecciones primarias; sin embargo, hay que tener en cuenta que en más de la mitad de los casos no disponemos de serologías gestacionales. Una posibilidad es que el porcentaje de casos debidos a reactivaciones o reinfecciones sea más elevado en el grupo de niños sin serologías maternas disponibles. Lo que sí parece claro es que una proporción elevada de los niños diagnosticados en España proceden de una primoinfección materna y por lo tanto se diagnosticarían durante la gestación si existiese un programa de cribado en la embarazada.

En cuanto al diagnóstico de la infección fetal, hay que destacar ciertos hallazgos. En nuestro estudio hay un alto porcentaje de amniocentesis negativas (35%), cifra mucho más alta que la de otros estudios publicados, en los que la sensibilidad de esta técnica ronda el 90% ^{11,49,50,58}. La explicación que podemos dar a este hecho es que 2 de cada 3 amniocentesis se realizaron antes de que hubieran transcurridos 6 semanas desde la infección y esto se ha relacionado con una mayor tasa de falsos negativos ^{11,49,50,58}. Otro problema es que algunas amniocentesis (n=4) se han efectuado antes de la semana vigésima de gestación. Como es bien conocido, hasta la semana 20ª el feto no comienza a producir

orina en el líquido amniótico en cantidad suficiente como para detectar el CMV y estas 4 amniocentesis fueron negativas^{11,49,50,54,56,58,107}. El riesgo de que la PCR sea negativa en la amniocentesis se asoció a realizar la prueba antes de las 20^a semanas de edad gestacional ($p=0,012$; $OR=1,3$ ($IC95\%: 1,01-1,77$)). Por lo tanto, siempre se debe esperar al menos 6 semanas desde la infección y realizar la amniocentesis por encima de las 20 semanas de edad gestacional.

8.9 Características del niño

Un 17,3% de los casos se diagnosticaron fuera del periodo neonatal (diagnóstico retrospectivo). Más de la mitad de los casos diagnosticados fuera del periodo neonatal no habían pasado el cribado auditivo neonatal. Como ha apuntado nuestro grupo en otro trabajo previo y otros muchos investigadores, la presencia de hipoacusia al nacimiento obliga a descartar una infección congénita por CMV^{71,91,122,127,142,157}. Realizar el cribado en los niños que no pasan los potenciales auditivos al nacer evitaría un retraso diagnóstico y permitiría iniciar el tratamiento antiviral y rehabilitador de manera precoz.

Un tercio de los niños presentaban alteraciones en la exploración física al nacer, siendo las petequias y el bajo peso los hallazgos más habituales. Boppana *et al* también encontraron que las de petequias eran el hallazgo clínico más frecuente entre los niños sintomáticos, aunque la ictericia era más frecuente que en nuestro estudio^{63,64}. En un 30% de los niños había alteraciones en la analítica al nacer, entre las que destacaba por su frecuencia la trombopenia. En los estudios

de Boppana *et al*, las alteraciones analíticas más habituales fueron la elevación de la GPT y la hiperbilirrubinemia directa^{63,64}. En nuestro estudio, la elevación de la GPT es bastante menos frecuente que lo descrito por Boppana, y una posible explicación es que los pacientes sintomáticos en nuestra muestra tengan una menor afectación sistémica. Ya se ha comentado que las mejoras en las técnicas diagnósticas prenatales (mejoría de la ecografía fetal, resonancia magnética fetal, amniocentesis y cordocentesis) hacen que en muchos casos con afectación fetal grave se interrumpa la gestación. Por otro lado, la administración de inmunoglobulina intravenosa podría reducir la gravedad de los casos sintomáticos, pero esta hipótesis aún no ha sido confirmada.

8.9.1 Diagnóstico

Un hallazgo destacable es la baja sensibilidad de la IgM en la detección de la infección congénita, que fue positiva sólo en 1 de cada 3 niños. Este dato confirma los resultados previamente publicados sobre la IgM, y contraindica la utilización de esta técnica de manera aislada para el diagnóstico de la infección congénita^{11,50,86}.

En cuanto a las técnicas virológicas, los datos obtenidos son similares a los resultados publicados en estudios previos^{82-85,88,89,158}. El cultivo en orina mediante *Shell Vial* tiene una sensibilidad del 91%, pero la sensibilidad de la PCR en orina (97%) y en saliva (100%) son más altas. Por este motivo, cada vez más laboratorios utilizan la PCR en orina o saliva para el diagnóstico. La PCR

en saliva podría utilizarse como técnica de elección para el cribado de la infección congénita por su alta sensibilidad y especificidad y la facilidad de recogida^{83,85,88,89}; sin embargo, se han descrito casos de falsos positivos secundarios a la lactancia materna⁹⁰, lo que podría limitar sus aplicaciones. Nuestra recomendación es que en los pacientes con una alta sospecha de CMVc se utilice un segundo test virológico si el primero es negativo, especialmente si se ha utilizado solo el cultivo viral de orina mediante *Shell Vial*. Otro punto importante es realizar una recogida adecuada de la muestra. Se han descrito falsos negativos en los cultivos virales cuando la orina se ha recogido mediante un algodón puesto en el pañal¹⁵⁹

Con respecto a la PCR en sangre, es necesario enfatizar que hasta en un 15% de los casos de CMVc fue negativa, por lo que no debe utilizarse de manera aislada en el diagnóstico. Estos datos son similares a los publicados por otros autores que refieren una sensibilidad de la prueba del 85-90%^{81,86}. No se encontraron diferencias significativas entre la carga viral en sangre en función del momento de realización de la prueba

8.10 Tratamiento antiviral

El tratamiento antiviral postnatal ha modificado el pronóstico de los niños con CMVc, limitando la progresión de la hipoacusia y mejorando el neurodesarrollo^{101,103,113,160,161}. En nuestro estudio, 2/3 de los niños recibieron algún tratamiento antiviral. El tiempo medio de tratamiento antiviral total es de casi 3 meses. El

primer ensayo clínico realizado por el grupo de Kimberlin se realizó con ganciclovir intravenoso durante 6 semanas¹⁰¹. La dificultad de mantener un tratamiento intravenoso prolongado y la necesidad de una larga hospitalización complicaba su uso. Se investigó la farmacocinética y farmacodinamia del valganciclovir por vía oral y se establecieron las dosis equivalentes al ganciclovir i.v.¹²³. Desde entonces, se está utilizando en nuestro medio el valganciclovir oral combinado o no con el ganciclovir intravenoso para el tratamiento de los niños con afectación del SNC y/o hipoacusia⁷⁹. Recientemente, se ha confirmado el beneficio de el tratamiento prolongado con valganciclovir (6 meses) frente al tratamiento estándar de 6 semanas, con una menor tasa de progresión de la hipoacusia y mejores resultados neurocognitivos, aunque las diferencias con la pauta antiviral corta son discretas¹⁰³. Por todo ello, en los primeros años muchos pacientes recibieron una pauta corta y progresivamente un mayor número de niños realizaron una pauta larga de 6 meses con valganciclovir oral. Un 65% de los niños recibieron una pauta que incluía valganciclovir y sólo un 5% recibieron sólo ganciclovir iv.

Durante el tratamiento con ganciclovir y valganciclovir un 11,5% y un 18,5%, respectivamente, presentaron neutropenia grave (<500 neutrófilos / μL). En los estudios publicados el porcentaje de neutropenia grado 3-4 (<1.000 neutrófilos / μL) es mayor entre los niños que reciben 6 semanas de ganciclovir iv (63%) que los que reciben el mismo tiempo valganciclovir v.o (19%)^{101,103}. En nuestro caso, el porcentaje de niños con neutropenia durante el tratamiento con ganciclovir

intravenoso es menor que con el valganciclovir oral porque la duración media del tratamiento iv fue menor (sólo un 5% de los niños con CMVc recibieron un ciclo completo de ganciclovir i.v de 6 semanas). No podemos comparar los datos de neutropenia con el estudio de Kimberlin *et al*¹⁰³ porque hemos recogido sólo los casos con neutropenia grado 4 (< 500 neutrófilos / μ L).

Destaca que dos niños con ganciclovir i.v (1,8%) y 4 con valganciclovir oral (3,2%) presentaron una anemia menor de 9 g/dL , y dos de ellos precisaron una transfusión de concentrado de hematíes por anemia grave (5,5 g/dL y de 6,2 g/dL). Este efecto adverso no ha sido descrito en los estudios de Kimberlin *et al* y debe ser tenido en cuenta a la hora de monitorizar a estos pacientes^{101,103}. En nuestro estudio se encontró una asociación entre al neutropenia y recibir un tratamiento prolongado (> de 6 semanas) (OR: 2,8 (IC95%: 1,3-6,5); p=0,01). La duración media del tratamiento entre los que presentan neutropenia es mayor que entre los que no desarrollan esta complicación (p=0,027). Al contrario de los resultados que encuentra Kimberlin¹⁰³, en nuestro caso el tratamiento prolongado se asocia a un mayor riesgo de neutropenia.

El tratamiento antiviral fue más prolongado entre los niños con hipoacusia o con alteraciones neurológicas. Hasta la publicación del ensayo clínico con valganciclovir, la duración del tratamiento antiviral no estaba bien determinada, e incluso el documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica dejaba la opción de prolongar el tratamiento hasta los 6

meses en los niños más sintomáticos⁷⁹. Por tanto, es lógico que los investigadores prolongasen el tratamiento en los casos más graves.

Los factores que más se asociaron a la administración del tratamiento antiviral fueron la presencia de microcefalia, esplenomegalia, ictericia o GPT elevada y también la presencia de alteraciones en la ecografía craneal neonatal o una PCR positiva en LCR, que coinciden con los criterios de tratamiento antiviral de muchos protocolos ^{79,103}.

8.11 Seguimiento

8.11.1 Antropometría

En el seguimiento se estudiaron una serie de variables antropométricas. Los niños con una infección congénita por CMV se encuentran a los 12 meses por debajo de los valores medios de la OMS de peso, talla y perímetro craneal. Aunque hay pocos estudios sobre la talla y el peso en el seguimiento de los niños con CMVc, en los que se han publicado no se encontraron diferencias relevantes con la población general^{162,163}. Es posible que al tener un mayor porcentaje de niños sintomáticos en nuestra muestra encontremos esas diferencias al comparar las medias con las tablas de referencia de la OMS. Entre los niños sintomáticos, hay un porcentaje considerable de niños con bajo peso para su edad gestacional al nacimiento, y al igual que ocurre en niños con bajo

peso por otros motivos, el peso y la talla son menores en los primeros años de vida.

8.11.2 Hipoacusia

Casi la mitad de los niños con CMVc presentaron hipoacusia a los 12 meses de vida en alguno de los dos oídos. Sin embargo, para poder determinar mejor el impacto que la hipoacusia pueda tener en la vida diaria es mejor valorar esta complicación en el mejor de los dos oídos. El 31,7% de los niños tenían hipoacusia en el mejor oído, la mayor parte de los casos leve (26-45 dB).

La prevalencia de un 45% de hipoacusia a los 12 meses es elevada. El promedio global de hipoacusia en los niños con CMV es un 15%, aunque entre los niños sintomáticos puede alcanzar un 30%- 65% ^{71,137}. En nuestra muestra, el porcentaje es elevado porque casi la mitad de los niños tenía síntomas al nacer y porque muchos se han diagnosticado precisamente por la presencia de hipoacusia en el primer año de vida.

8.11.3 Alteraciones neurológicas

Un 30% de los niños del estudio presentaron alguna alteración neurológica a los 12 meses de edad. Aunque este porcentaje es elevado para los niños con CMVc en general, es el esperable en una muestra donde los niños sintomáticos están sobrerrepresentados. Pass *et al* describieron hasta un 61% de secuelas neurológicas en un grupo de niños con CMVc sintomático⁶⁸. Ramsay *et al* estudiaron el desarrollo neurológico de 65 niños sintomáticos y encontraron

que la presencia de secuelas neurológicas fue mayor entre los niños con alguna clínica neurológica en el periodo neonatal (64%) que entre los niños con petequias y/o hepatoesplenomegalia pero sin clínica neurológica (23%). Noyola *et al* y Conboy *et al* también encontraron que un 50% de los niños con síntomas al nacer exhibían secuelas neurológicas^{22,65}. Sin embargo, entre los niños asintomáticos el porcentaje de secuelas neurológicas es mucho menor y se sitúa entre el 4-7,4%⁷². El porcentaje de secuelas neurológicas que hemos obtenido en nuestro estudio se encuentra en un punto intermedio del que se ha publicado para los niños sintomáticos y los niños asintomáticos, y podría responder al tipo de pacientes que se incluyeron en el estudio y al tratamiento antiviral que han recibido.

8.12 Limitaciones del estudio

El propio diseño del estudio conlleva importantes limitaciones. Es un estudio multicéntrico con un gran número de hospitales participantes y aunque este hecho permite reclutar un alto número de pacientes, también tiene sus aspectos negativos. En primer lugar, cada centro tiene un manejo de los pacientes que puede ser diferente en algunos aspectos y el cribado de la infección por CMV se realiza de manera diferente durante la gestación y en el niño. El manejo diagnóstico y terapéutico también puede diferir entre centros. Para intentar solventar este hecho hemos incluido como marco de referencia el Documento

de Consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el manejo de la infección congénita por CMV ⁷⁹.

Otras de las limitaciones propias del diseño es la gran heterogeneidad de las técnicas diagnósticas utilizadas entre los centros. No se dispone de carga viral en sangre, orina y saliva ni cultivo virales en orina en todos los pacientes y las técnicas utilizadas en cada centro pueden ser diferentes. Esto limita la posibilidad de obtener conclusiones significativas sobre el papel pronóstico de la carga viral en sangre y en otros fluidos.

Respecto a la PCR en el LCR, en algunos centros se realiza una punción lumbar de manera rutinaria y en otros sólo a los niños sintomáticos. Este hecho puede hacer que el porcentaje de niños con PCR positiva en LCR se encuentre sobreestimado, y también limitar la interpretación pronóstica de los resultados. Sin embargo, hemos encontrado un bajo porcentaje de PCR positivas en LCR y estos datos son similares a los comunicados en otros estudios ^{77,131,132}.

En cuanto a las técnicas de imagen, la principal limitación aparece con la subjetividad de la interpretación de las ecografías tanto fetales como neonatales. Es posible que en centros con menos experiencia con esta patología el rendimiento de esta prueba sea peor, pero los resultados obtenidos pueden dar una idea global del rendimiento promedio real de estas pruebas en nuestro país.

Otra limitación relevante es el método de evaluación neurológica en las visitas de seguimiento a los 6 y 12 meses de vida. Hemos definido la afectación

neurológica a los 6 y 12 meses como la existencia de alteraciones motoras (espasticidad o paresias), epilepsia que precise tratamiento farmacológico, coriorretinitis, retraso madurativo para su edad objetivado por un neurólogo infantil, y a los 12 meses la incapacidad para mantener la sedestación sin ayuda. En otros estudios, utilizaron diversas escalas de valoración neurocognitiva para poder cuantificar de manera más precisa la afectación neurológica^{65-69,128,148,149}.

Sin embargo, en la mayor parte de los centros participantes no disponían de la posibilidad de llevar a cabo este tipo de evaluaciones, por lo que se recogieron aquellos items que eran objetivos y relativamente sencillos de evaluar (alteraciones motoras, la epilepsia que precisa tratamiento farmacológico, la coriorretinitis y la incapacidad para mantener la sedestación de manera autónoma a los 12 meses). Por otro lado, un neurólogo infantil evaluó la presencia de retraso madurativo a los 6 y 12 meses de edad para intentar mejorar la valoración del desarrollo que realizaría un pediatra general, un infectólogo o un neonatólogo. El hecho de no disponer de una valoración cuantitativa de la afectación neurológica puede limitar nuestra capacidad para establecer conclusiones en cuanto al pronóstico neurológico, y es posible que se clasifiquen como niños sin secuelas neurológicas aquellos con una clínica más leve, que sólo pueda ser detectada mediante test neurocognitivos y de neurodesarrollo. Sin embargo, creemos que nuestro modelo permite detectar la mayor parte de los casos que tendrán secuelas neurológicas significativas. Se ha comprobado que el pronóstico neurológico de los niños que a los 12 meses

no tienen alteraciones neurológicas es excelente y no suelen desarrollar secuelas neurológicas posteriores¹⁶⁴. Es por ello por lo que hemos centrado el seguimiento en los primeros 12 meses de vida.

Una limitación muy importante es la dificultad de estudiar el papel de los antivirales en la prevención de las secuelas. Al no ser un estudio aleatorizado, se da la paradoja de que son los pacientes más graves al nacimiento y, por tanto, los que desarrollarán más secuelas, los que recibían más tiempo de tratamiento antiviral. El pediatra al nacer un niño grave, o si este desarrolla hipoacusia o alteraciones neurológicas durante el seguimiento, decide realizar un tratamiento más prolongado. Por otro lado, hemos demostrado que ciertos hallazgos clínicos al nacer condicionan la decisión del médico de iniciar un tratamiento antiviral, por lo que no se ha podido incluir esta variable en los modelos pronósticos evaluados.

9. CONCLUSIONES

9 CONCLUSIONES

1. La presencia de alteraciones en la ecografía fetal es un factor de riesgo independiente asociado a las secuelas auditivas y neurológicas a largo plazo. En los fetos infectados por CMV, una ecografía normal no descarta la afectación del SNC al nacimiento.
2. Los niños con menor edad gestacional en el momento de la infección fetal tienen un mayor riesgo de secuelas auditivas y neurológicas.
3. La esplenomegalia y la hipoacusia al nacimiento son factores de riesgo independientes asociados al desarrollo de hipoacusia a largo plazo. Las alteraciones en la ecografía neonatal y la carga viral no fueron predictoras del desarrollo de hipoacusia.
4. La elevación de la GPT > 80 UI/L y la hipoacusia al nacimiento son factores de riesgo independientes de desarrollo de secuelas neurológicas a largo plazo.
5. El papel pronóstico de la ecografía neonatal es limitado. Un tercio de los niños con una ecografía neonatal normal presentaron alteraciones en la RMN. Recomendamos realizar una RMN a todos los niños con citomegalovirus congénito.
6. Los modelos desarrollados para conocer el riesgo de hipoacusia y de secuelas neurológicas tienen un alto poder predictivo, presentando unas

AUC elevadas (AUC: 0,902; IC95%: 0,83-0,97 y AUC: 0,88; IC95%: 0,8-0,96 respectivamente).

7. Una PCR positiva en LCR en niños con alteraciones en la ecografía neonatal se asocia a un mayor riesgo de hipoacusia. No existe evidencia para recomendar la realización rutinaria de una punción lumbar en todos los niños con citomegalovirus congénito.
8. No se ha demostrado que la presencia de vasculopatía lenticuloestriada (VLE) de manera aislada se asocie un mayor riesgo de hipoacusia o de alteraciones neurológicas. En los niños con otras alteraciones ecográficas, la presencia de VLE sí aumenta el riesgo de hipoacusia.
9. Es necesario que la amniocentesis se realice a partir de las vigésima semana de edad gestacional y seis semanas después de la infección materna. Realizar antes la amniocentesis se asocia un mayor riesgo de falsos negativos en el diagnóstico de la infección fetal.

10. BIBLIOGRAFÍA

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):86-102.
2. Weller TH. Review. Cytomegaloviruses: the difficult years. *J Infect Dis.* 1970;122(6):532-9.
3. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):76-98.
4. Remington JS, Klein JO. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 7th Edition.* Philadelphia, PA: Elsevier. W.B.Saunders, 2011; 2001.
5. Zuckerman AJ. *Principles and Practice of Clinical Virology.* (John Wiley & Sons Ltd, ed.). West Sussex: John Wiley & Sons Ltd; 2009.
6. Vries JJC De, Korver AMH, Verkerk PH, et al. Congenital Cytomegalovirus Infection in the Netherlands®: Birth Prevalence and Risk Factors. *J Virol Methods.* 2011;1782(June):1777-1782.
7. Seme K, Puklavec E, Paro-panjan D, Poljak M. Prevalence of Congenital Cytomegalovirus Infection in Slovenia®: A Study on 2 , 841 Newborns. *J Med Virol.* 2011;(August):1-7.

8. Kharrazi M, Hyde T, Young S, Amin MM, Cannon MJ, Dollard SC. Use of screening dried blood spots for estimation of prevalence, risk factors, and birth outcomes of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2010;157:191-7 ST .
9. Pérez-Rivilla A, Tejedor J, Gómez-Garcés J. Incidencia de infección congénita por citomegalovirus (CMV) en un area del sur de Madrid. VII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Torremolinos, Málaga. 1996:156; A20/8.
10. Barbi M, Binda S, Caroppo S, et al. Multicity Italian study of congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25(2):156-9.
11. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother , Fetus , and Newborn Infant. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(4):680-715.
12. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*. 2010;20(4):202-13.
13. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Moura Brito RM, et al. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin Infect Dis*. 2009;49(4):522-8.
14. Dar L, Pati SK, Patro ARK, et al. Congenital cytomegalovirus infection in a highly seropositive semi-urban population in India. *Pediatr Infect Dis J*.

- 2008;27(9):841-3.
15. de Ory F, Ramírez R, García Comas L, León P, Sagües MJ, Sanz JC. Is there a change in cytomegalovirus seroepidemiology in Spain? *Eur J Epidemiol.* 2004;19(1):85-9.
 16. Marín Gabriel MA, Fernández Ibieta M, González Tomé MI, et al. [Congenital cytomegalovirus infection in the infants of HIV-infected mothers]. *An Pediatr.* 2005;62(1):38-42.
 17. Guibert G, Warszawski J, Le Chenadec J, et al. Decreased risk of congenital cytomegalovirus infection in children born to HIV-1-infected mothers in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2009;48(11):1516-25.
 18. Álvarez Domínguez E, Figueras Aloy J, Botet Mussons F, Marcos Maeso MA, Pérez Fernández JM. [Screening for cytomegalovirus infection in very low birth weight infants]. *An Pediatr (Barc).* 2013;79(1):3-9.
 19. Turner KM, Lee HC, Boppana SB, Carlo WA, Randolph DA. Incidence and impact of CMV infection in very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2014;133(3):e609-15.
 20. Holt PG, Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy.* 2000;55(8):688-97.
 21. Schleiss MR. Cytomegalovirus in the neonate: immune correlates of

- infection and protection. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:501801.
22. Noyola DE, Demmler GJ, Nelson CT, et al. Early predictors of neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2001;138(3):325-31.
 23. Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya C V, Razonable RR. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis*. 2007;44(10):1315-20.
 24. Chaudhuri S, Lowen B, Chan G, Davey A, Riddell M, Guilbert LJ. Human cytomegalovirus interacts with toll-like receptor 2 and CD14 on syncytiotrophoblasts to stimulate expression of TNFalpha mRNA and apoptosis. *Placenta*. 2009;30(11):994-1001.
 25. Scott GM, Chow SSW, Craig ME, et al. Cytomegalovirus infection during pregnancy with maternofetal transmission induces a proinflammatory cytokine bias in placenta and amniotic fluid. *J Infect Dis*. 2012;205(8):1305-10.
 26. Timón M, Arnaiz-Villena A, Ruiz-Contreras J, Ramos-Amador JT, Pacheco A, Regueiro JR. Selective impairment of T lymphocyte activation through the T cell receptor/CD3 complex after cytomegalovirus infection. *Clin Exp Immunol*. 1993;94(1):38-42.
 27. Lilleri D, Fornara C, Furione M, Zavattoni M, Revello MG, Gerna G. Development of human cytomegalovirus-specific T cell immunity during

- primary infection of pregnant women and its correlation with virus transmission to the fetus. *J Infect Dis.* 2007;195(7):1062-70.
28. Revello MG, Lilleri D, Zavattoni M, et al. Lymphoproliferative response in primary human cytomegalovirus (HCMV) infection is delayed in HCMV transmitter mothers. *J Infect Dis.* 2006;193(2):269-76.
29. Lilleri D, Fornara C, Revello MG, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific memory CD8⁺ and CD4⁺ T cell differentiation after primary infection. *J Infect Dis.* 2008;198(4):536-43.
30. Revello MG, Fabbri E, Furione M, et al. Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: A 20-year experience. *J Clin Virol.* 2011;50(4):303-307.
31. Pereira L, Pettitt M, Tabata T. Cytomegalovirus infection and antibody protection of the developing placenta. *Clin Infect Dis.* 2013;57:S174-7.
32. Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics.* 1999;104:55-60.
33. Bodéus M, Hubinont C, Goubau P. Increased risk of cytomegalovirus transmission in utero during late gestation. *Obs Gynecol.* 1999;93(98):658-660.

34. Enders G, Daiminger A, Bäder U, Exler S, Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol.* 2011;52(3):244-246.
35. Stagno S, Pass RF, Cloud G, et al. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA.* 1986;256(14):1904-8.
36. Yamamoto-Tabata T, McDonagh S, Chang H-T, Fisher S, Pereira L. Human cytomegalovirus interleukin-10 downregulates metalloproteinase activity and impairs endothelial cell migration and placental cytotrophoblast invasiveness in vitro. *J Virol.* 2004;78(6):2831-2840.
37. Tabata T, Kawakatsu H, Maidji E, et al. Induction of an epithelial integrin alpha v beta 6 in human cytomegalovirus-infected endothelial cells leads to activation of transforming growth factor-beta 1 and increased collagen production. *Am Jour Pathol.* 2008;172(4):1127-1140.
38. Cheeran MC-J, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):99-126.
39. Barkovich AJ, Lindan CE. Congenital cytomegalovirus infection of the brain: imaging analysis and embryologic considerations. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1994;15(4):703-15.

40. Cheeran MCJ, Hu S, Ni HT, et al. Neural precursor cell susceptibility to human cytomegalovirus diverges along glial or neuronal differentiation pathways. *J Neurosci Res.* 2005;82(6):839-850.
41. Perlman JM, Argyle C. Lethal cytomegalovirus infection in preterm infants: clinical, radiological, and neuropathological findings. *Ann Neurol.* 1992;31(1):64-8.
42. Schmidbauer M, Budka H, Ulrich W, Ambros P. Cytomegalovirus (CMV) disease of the brain in AIDS and connatal infection: a comparative study by histology, immunocytochemistry and in situ DNA hybridization. *Acta Neuropathol.* 1989;79(3):286-293.
43. Shinmura Y, Kosugi I, Aiba-Masago S, Baba S, Yong LR, Tsutsui Y. Disordered migration and loss of virus-infected neuronal cells in developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus. *Acta Neuropathol.* 1997;93(6):551-557.
44. Gabrielli L, Bonasoni MP, Santini D, et al. Human fetal inner ear involvement in congenital cytomegalovirus infection. *Acta Neuropathol Commun.* 2013;1(1):63.
45. Bradford RD, Yoo Y-G, Golemac M, Pugel EP, Jonjic S, Britt WJ. Murine CMV-induced hearing loss is associated with inner ear inflammation and loss of spiral ganglia neurons. *PLoS Pathog.* 2015;11(4):e1004774.
46. Strauss M. Human cytomegalovirus labyrinthitis. *Am J Otolaringol.*

- 1990;11(5):292-8.
47. Strauss M. A clinical pathologic study of hearing loss in congenital cytomegalovirus infection. *Laryngoscope*. 1985;95(8):951-62.
 48. Fagerheim T, Nilssen O, Raeymaekers P, et al. Identification of a new locus for autosomal dominant non-syndromic hearing impairment (DFNA7) in a large Norwegian family. *Hum Mol Genet*. 1996;5(8):1187-91.
 49. Revello MG, Lilleri D, Zavattoni M, Furione M, Middeldorp J, Gerna G. Prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection in amniotic fluid by nucleic acid sequence-based amplification assay. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1772-4.
 50. Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol*. 2008;41(3):192-7.
 51. Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Fabbri E, Gerna G. Preconceptional primary human cytomegalovirus infection and risk of congenital infection. *J Infect Dis*. 2006;193(6):783-7.
 52. Feldman B, Yinon Y, Tepperberg Oikawa M, Yoeli R, Schiff E, Lipitz S. Pregestational, periconceptional, and gestational primary maternal cytomegalovirus infection: prenatal diagnosis in 508 pregnancies. *Am J Obs Gynecol*. 2011;205(4):342.e1-6.

53. Lazzarotto T, Spezzacatena P, Pradelli P, Abate DA, Varani S, Landini MP. Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997;4(4):469-73.
54. Lazzarotto T, Gabrielli L, Lanari M, et al. Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. *Hum Immunol.* 2004;65(5):410-5.
55. Arora N, Novak Z, Fowler KB, Boppana SB, Ross SA. Cytomegalovirus viruria and DNAemia in healthy seropositive women. *J Infect Dis.* 2010;202(12):1800-3.
56. Zavattoni M, Lombardi G, Rognoni V, et al. Maternal, fetal, and neonatal parameters for prognosis and counseling of HCMV congenital infection. *J Med Virol.* 2014;86(12):2163-70.
57. Lazzarotto T, Varani S, Guerra B, Nicolosi A, Lanari M, Landini MP. Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 2000;137(1):90-5.
58. Enders G, Bäder U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn.* 2001;21(5):362-77.
59. Farkas N, Hoffmann C, Ben-Sira L, et al. Does normal fetal brain

- ultrasound predict normal neurodevelopmental outcome in congenital cytomegalovirus infection? *Prenat Diagn*. 2011;31(4):360-6.
60. Malinge G, Lev D, Lerman-Sagie T. Imaging of fetal cytomegalovirus infection. *Fetal Diagn Ther*. 2011;29(2):117-26.
 61. Guerra B, Simonazzi G, Puccetti C, et al. Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obs Gynecol*. 2008;198(4):380.e1-7.
 62. Benoist G, Salomon LJ, Mohlo M, Suarez B, Jacquemard F, Ville Y. Cytomegalovirus-related fetal brain lesions: comparison between targeted ultrasound examination and magnetic resonance imaging. *Ultrasound Obs Gynecol*. 2008;32(7):900-5.
 63. Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S, Alford CA. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J*. 1992;11:93-9.
 64. Dreher AM, Arora N, Fowler KB, et al. Spectrum of disease and outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2014;164(4):855-9.
 65. Conboy TJ, Pass RF, Stagno S, et al. Early clinical manifestations and intellectual outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 1987;111(3):343-8.

66. Conboy TJ, Pass RF, Stagno S, et al. Intellectual development in school-aged children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics*. 1986;77(6):801-6.
67. Jones CA, Isaacs D. Predicting the outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Paediatr Child Heal*. 1995;31(2):70-1.
68. Pass RF, Stagno S, Myers GJ, Alford CA. Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of long-term longitudinal follow-up. *Pediatrics*. 1980;66:758-62.
69. Ramsay ME, Miller E, Peckham CS. Outcome of confirmed symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Arch Dis Child*. 1991;66(9):1068-9.
70. Bernard S, Wiener-Vacher S, Van Den Abbeele T, Teissier N. Disorders in Children With Congenital Cytomegalovirus Infection. *Pediatrics*. 2015;136(4).
71. Goderis J, De Leenheer E, Smets K, Van Hoecke H, Keymeulen A, Dhooge I. Hearing loss and congenital CMV infection: a systematic review. *Pediatrics*. 2014;134(5):972-82.
72. Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol*. 2007;17:355-63.
73. Misono S, Sie KCY, Weiss NS, et al. Congenital cytomegalovirus infection

- in pediatric hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;137(1):47-53.
74. Korver AM, de Vries JJ, Konings S, et al. DECIBEL study: Congenital cytomegalovirus infection in young children with permanent bilateral hearing impairment in the Netherlands. *J Clin Virol*. 2009;46 Suppl 4:S27-31.
75. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Ambrosetti U, Corbetta C, Sergi P. A wider role for congenital cytomegalovirus infection in sensorineural hearing loss. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(1):39-42.
76. Coats DK, Demmler GJ, Paysse EA, Du LT, Libby C. Ophthalmologic findings in children with congenital cytomegalovirus infection. *J AAPOS*. 2000;4:110-6.
77. Alarcon A, Martinez-Biarge M, Cabañas F, Hernanz A, Quero J, Garcia-Alix A. Clinical, biochemical, and neuroimaging findings predict long-term neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2013;163(3):828-34.e1.
78. Amir J, Schwarz M, Levy I, Haimi-Cohen Y, Pardo J. Is lenticulostriated vasculopathy a sign of central nervous system insult in infants with congenital CMV infection? *Arch Dis Child*. 2011;96(9):846-50.
79. Baquero-Artigao F. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la

- infección congénita por citomegalovirus. *An Pediatr*. 2009;71(6):535-47.
80. Lanari M, Capretti MG, Lazzarotto T, et al. Neuroimaging in CMV congenital infected neonates: how and when. *Early Hum Dev*. 2012;88 Suppl 2:S3-5.
 81. Ross SA, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2005;16(1):44-9.
 82. Boppana S, Smith R, Stagno S, Britt WJ. Evaluation of a microtiter plate fluorescent-antibody assay for rapid detection of human cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol*. 1992;30(3).
 83. Ross SA, Ahmed A, Palmer AL, et al. Detection of congenital cytomegalovirus infection by real-time polymerase chain reaction analysis of saliva or urine specimens. *J Infect Dis*. 2014;210(9):1415-8.
 84. de Vries JJC, van der Eijk AA, Wolthers KC, et al. Real-time PCR versus viral culture on urine as a gold standard in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol*. 2012;53(2):167-70.
 85. Koyano S, Inoue N, Oka A, et al. Screening for congenital cytomegalovirus infection using newborn urine samples collected on filter paper: feasibility and outcomes from a multicentre study. *BMJ Open*. 2011;1(1):e000118.
 86. Revello MG, Zavattoni M, Baldanti F, Sarasini A, Paolucci S, Gerna G.

- Diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody in blood of congenitally infected newborns. *J Clin Virol.* 1999;14(1):57-66.
87. Lurain NS, Thompson KD, Farrand SK. Rapid detection of cytomegalovirus in clinical specimens by using biotinylated DNA probes and analysis of cross-reactivity with herpes simplex virus. *J Clin Microbiol.* 1986;24(5):724-30.
88. Boppana SB, Ross S a, Shimamura M, et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med.* 2011;364(22):2111-8.
89. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Marin LJ, Brito RM, Oliveira PFC, Coelho TB. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? *J Clin Virol.* 2006;36(3):228-30.
90. Koyano S, Inoue N, Nagamori T, Moriuchi H, Azuma H. Newborn screening of congenital cytomegalovirus infection using saliva can be influenced by breast feeding. *Arch Dis Child.* 2013;98(2):F182.
91. Nuñez-Ramos R, Becerril J, Blázquez D, Rojo P, de Vergas J, Folgueira D. [Early diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: lost opportunities]. *Enferm Infecc Microbiol.* 2013;31(2):93-6.
92. Wang L, Xu X, Zhang H, Qian J, Zhu J. Dried blood spots PCR assays to

- screen congenital cytomegalovirus infection: a meta-analysis. *Vir.* 2015;12(1):60.
93. Boppana SB, Ross SA, Novak Z, et al. Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA*. 2010;303:1375-82.
94. Leruez-Ville M, Vauloup-Fellous C, Couderc S, et al. Prospective identification of congenital cytomegalovirus infection in newborns using real-time polymerase chain reaction assays in dried blood spots. *Clin Infect Dis*. 2011;52(5):575-81.
95. de Vries JJC, Claas ECJ, Kroes ACM, Vossen ACTM. Evaluation of DNA extraction methods for dried blood spots in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol*. 2009;46 Suppl 4:S37-42.
96. Vives-Oñós I, Soler-Palacín P, Codina-Grau MG, et al. [Can we rule out a congenital cytomegalovirus infection when the result of polymerase chain reaction in dried blood spots is negative?]. *Enferm Infecc Microbiol*. 2014;32(9):570-3.
97. Tagawa M, Tanaka H, Moriuchi M, Moriuchi H. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection at a school for the deaf by using preserved dried umbilical cord. *J Pediatr*. 2009;155(5):749-51.
98. Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, et al. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally

- infected newborns. *Pediatrics*. 2006;117(1):e76-83.
99. Forner G, Abate D, Mengoli C, Palù G, Gussetti N. High Cytomegalovirus (CMV) DNAemia Predicts CMV Sequelae in Asymptomatic Congenitally Infected Newborns Born to Women With Primary Infection During Pregnancy. *J Infect Dis*. 2015;212(1):67-71.
 100. Cannon MJ, Hyde TB, Schmid DS. Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection. *Revi Med Virol*. 2011;21(4):240-55.
 101. Kimberlin DW, Lin C-Y, Sánchez PJ, et al. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J Pediatr*. 2003;143(1):16-25.
 102. Nassetta L, Kimberlin D, Whitley RC-P. Treatment of congenital cytomegalovirus infection: implications for future therapeutic strategies. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(5):862-7.
 103. Kimberlin DW, Jester PM, Sánchez PJ, et al. Valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *N Engl J Med*. 2015;372(10):933-43.
 104. Swanson EC, Schleiss MR. Congenital Cytomegalovirus Infection. New Prospects for Prevention and Therapy. *Pediatr Clin N Am*. 2013;60(2):335-349.

105. Gandhi RS, Fernandez-Alvarez JR, Rabe H. Management of congenital cytomegalovirus infection: an evidence-based approach. *Acta Paediatr.* 2010;99(4):509-15.
106. Gwee A CN. Which infants with congenital cytomegalovirus infection benefit from antiviral therapy ? *Arch Dis Child.* 2014 Jun;99(6):597-601.
107. Goegebuer T, Van Meensel B, Beuselinck K, et al. Clinical predictive value of real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples. *J Clin Virol.* 2009;47(3):660-5.
108. Fabbri E, Revello MG, Furione M, et al. Prognostic markers of symptomatic congenital human cytomegalovirus infection in fetal blood. *BJOG.* 2011;118(4):448-56.
109. Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 2005;353(13):1350-62.
110. Visentin S, Manara R, Milanese L, et al. Early primary cytomegalovirus infection in pregnancy: maternal hyperimmunoglobulin therapy improves outcomes among infants at 1 year of age. *Clin Infect Dis.* 2012;55(4):497-503.
111. Buxmann H, Stackelberg OM v, Schlößer RL, et al. Use of cytomegalovirus hyperimmunoglobulin for prevention of congenital

- cytomegalovirus disease: a retrospective analysis. *J Perinat Med*. 2012;40(4):439-46.
112. Revello MG, Lazzarotto T, Guerra B, et al. A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. *N Engl J Med*. 2014;370(14):1316-26.
113. Oliver SE, Cloud GA, Sánchez PJ, et al. Neurodevelopmental outcomes following ganciclovir therapy in symptomatic congenital cytomegalovirus infections involving the central nervous system. *J Clin Virol*. 2009;46 Suppl 4:S22-6.
114. Boppana SB, Ross S a, Fowler KB. Congenital cytomegalovirus infection: clinical outcome. *Clin Infect Dis*. 2013;57:S178-81.
115. Rivera LB, Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Predictors of hearing loss in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics*. 2002;110(4):762-7.
116. Ancora G, Lanari M, Lazzarotto T, et al. Cranial ultrasound scanning and prediction of outcome in newborns with congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2007;150(2):157-61.
117. Capretti MG, Lanari M, Tani G, et al. Role of cerebral ultrasound and magnetic resonance imaging in newborns with congenital cytomegalovirus infection. *Brain Dev*. 2014;36(3):203-11.

118. Ureta-Velasco N, Martínez-de Aragón A, Moral-Pumarega MT, Núñez-Enamorado N, Bergón-Sendín E, Pallás-Alonso CR. [Magnetic resonance imaging without sedation in neonates]. *An Pediatr*. 2015;82(5):354-9.
119. Walter S, Atkinson C, Sharland M, et al. Congenital cytomegalovirus: association between dried blood spot viral load and hearing loss. *Arch Dis Child*. 2008;93(4):F280-5.
120. Bradford RD, Cloud G, Lakeman AD, et al. Detection of cytomegalovirus (CMV) DNA by polymerase chain reaction is associated with hearing loss in newborns with symptomatic congenital CMV infection involving the central nervous system. *J Infect Dis*. 2005;191(2):227-33.
121. Ross SA, Novak Z, Fowler KB, Arora N, Britt WJ, Boppana SB. Cytomegalovirus blood viral load and hearing loss in young children with congenital infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(7):588-92.
122. Boppana SB, Fowler KB, Pass RF, et al. Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J Pediatr*. 2005;146(6):817-23.
123. Kimberlin DW, Acosta EP, Sánchez PJ, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment of oral valganciclovir in the treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *J Infect Dis*. 2008;197(6):836-45.
124. de Vries JJC, Vossen ACTM, Kroes ACM, van der Zeijst BAM.

- Implementing neonatal screening for congenital cytomegalovirus: addressing the deafness of policy makers. *Rev Med Virol.* 2011;21(1):54-61.
125. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inf.* 2009;42(2):377-81.
 126. González LI, Folgueira-Sánchez MD, Rojo-Conejo P, González-Tomé MI. [Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in a neonate by dried blood spot testing]. *Enferm Infecc Microbiol.* 2010;28(3):208.
 127. Fowler KB, McCollister FP, Dahle AJ, Boppana S, Britt WJ, Pass RF. Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 1997;130(4):624-30.
 128. Frankenburg WK, Dodds J, Archer P, Shapiro H, Bresnick B. The Denver II: a major revision and restandardization of the Denver Developmental Screening Test. *Pediatrics.* 1992;89(1):91-7.
 129. Doménech JM; Navarro JB. *Regresión Logística Binaria, Multinomial, de Poisson Y Binomial Negativa.* 6ª ed. Barcelona: Signo; 2011.
 130. Hosmer DW, Jr., Lemeshow S. *Applied Logistic Regression.* Second Edi. (John Wiley and Sons, ed.). New York; 2004.

131. Troendle Atkins J, Demmler GJ, Williamson WD, McDonald JM, Istas AS, Buffone GJ. Polymerase chain reaction to detect cytomegalovirus DNA in the cerebrospinal fluid of neonates with congenital infection. *J Infect Dis.* 1994;169(6):1334-7.
132. Halwachs-Baumann G, Genser B, Pailer S, et al. Human cytomegalovirus load in various body fluids of congenitally infected newborns. *J Clin Virol.* 2002;25 Suppl 3:S81-7.
133. Bilavsky E, Schwarz M, Pardo J, et al. Lenticulostriated vasculopathy is a high-risk marker for hearing loss in congenital cytomegalovirus infections. *Acta Paediatr.* 2015;104(9):e388-e394.
134. Hong S-Y, Yang J-J, Li S-Y, Lee I-C. Lenticulostriate Vasculopathy in Brain Ultrasonography is Associated with Cytomegalovirus Infection in Newborns. *Pediatr Neonatol.* May 2015 [Epub ahead of print].
135. Zavattoni M, Rustico M, Tassis B, et al. Risk of congenital disease in 46 infected fetuses according to gestational age of primary human cytomegalovirus infection in the mother. *J Med Virol.* June 2015.
136. Japanese Congenital Cytomegalovirus Infection Immunoglobulin Fetal Therapy Study Group. A trial of immunoglobulin fetal therapy for symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Reprod Immunol.* 2012;95(1-2):73-9.

137. Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J Clin Virol.* 2006;35:226-31.
138. Li L-Q, Tan J-J, Zhou Y, Yu J-L. Does congenital cytomegalovirus infection lead to hearing loss by inducing mutation of the GJB2 gene? *Pediatr Res.* 2013;74(2):121-6.
139. Nystad M, Fagerheim T, Brox V, Fortunato EA, Nilssen Ø. Human cytomegalovirus (HCMV) and hearing impairment: infection of fibroblast cells with HCMV induces chromosome breaks at 1q23.3, between loci DFNA7 and DFNA49 -- both involved in dominantly inherited, sensorineural, hearing impairment. *Mutat Res.* 2008;637(1-2):56-65.
140. Patricia Brañas, Daniel Blázquez-Gamero, Alberto Galindo, Columbian Prieto, Iciar Olabarrieta, Irene Cuadrado and LF. Cytomegalovirus Genotype Distribution Among Congenitally and Postnatally Infected Patients: Association of Particular gB and gN Types with Symptomatic Disease. *Open Forum Infect Dis.* 2015. [Epub ahead of print].
141. del Rosal T, Baquero-Artigao F, Blázquez D, et al. Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection beyond the neonatal period. *J Clin Virol.* 2012;55(1):72-4.
142. Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J Clin Virol.* 2006;35(2):226-31.
143. Bilavsky E, Schwarz M, Bar-Sever Z, Pardo J, Amir J. Hepatic

- involvement in congenital cytomegalovirus infection - infrequent yet significant. *J Viral Hepat.* 2015;22(9):763-8.
144. Fink KR, Thapa MM, Ishak GE, Pruthi S. Neuroimaging of pediatric central nervous system cytomegalovirus infection. *Radiographics.* 2010;30(7):1779-96.
145. de Vries LS, Gunardi H, Barth PG, Bok LA, Verboon-Maciolek MA, Groenendaal F. The spectrum of cranial ultrasound and magnetic resonance imaging abnormalities in congenital cytomegalovirus infection. *Neuropediatrics.* 2004;35(2):113-9.
146. Oosterom N, Nijman J, Gunkel J, et al. Neuro-Imaging Findings in Infants with Congenital Cytomegalovirus Infection: Relation to Trimester of Infection. *Neonatology.* 2015;107(4):289-296.
147. Ahlfors K, Ivarsson SA, Harris S. Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of prospective studies available in the literature. *Scand J Infect Dis.* 1999;31(5):443-57.
148. Pearl KN, Preece PM, Ades A, Peckham CS. Neurodevelopmental assessment after congenital cytomegalovirus infection. *Arch Dis Child.* 1986;61(4):323-6.
149. Williamson WD, Percy AK, Yow MD, et al. Asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. Audiologic, neuroradiologic, and

- neurodevelopmental abnormalities during the first year. *Am J Dis Child*. 1990;144(12):1365-8.
150. Starr JG, Bart RD, Gold E. Inapparent Congenital Cytomegalovirus Infection. *N Engl J Med*. 1970;282(19):1075-1078.
 151. Cantey JB, Sisman J. The etiology of lenticulostriate vasculopathy and the role of congenital infections. *Early Hum Dev*. 2015;91(7):427-430.
 152. Weber K, Riebel T, Nasir R. Hyperechoic lesions in the basal ganglia: an incidental sonographic finding in neonates and infants. *Pediatr Radiol*. 1992;22(3):182-6.
 153. Instituto Nacional de Estadística. *Estadística de Migraciones*. 2014.
Disponible en:
www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=%2Ft20%2Fp277&file=inebase&L=0
 154. Santiago B, Blázquez D, López G, et al. [Serological profile of immigrant pregnant women against HIV, HBV, HCV, rubella, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, and *Trypanosoma cruzi*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(2):64-9.
 155. Prieto LM, González-Tomé M-I, Muñoz E, et al. Low rates of mother-to-child transmission of HIV-1 and risk factors for infection in Spain: 2000-2007. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(10):1053-8.

156. Guillén S, Prieto L, Jiménez de Ory S, et al. [New diagnosis of HIV infection in children]. *Enferm Infecc Microbiol.* 2012;30(3):131-6.
157. Grosse SD, Ross DS, Dollard SC. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a quantitative assessment. *J Clin Virol.* 2008;41(2):57-62.
158. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Pinto PC, Figueiredo LT, Jorge SM. Usefulness of blood and urine samples collected on filter paper in detecting cytomegalovirus by the polymerase chain reaction technique. *J Virol Methods.* 2001;97(1-2):159-64.
159. Ross SA, Ahmed A, Palmer AL, et al. Urine Collection Method for the Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(8):903-5.
160. Gwee A, Curtis N, Garland SM, Connell TG, Daley AJ. Which infants with congenital cytomegalovirus infection benefit from antiviral therapy? *Arch Dis Child.* 2014;99(6):597-601.
161. Amir J, Wolf DG, Levy I. Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection with intravenous ganciclovir followed by long-term oral valganciclovir. *Eur J Pediatr.* 2010;169(9):1061-7.
162. Shan R, Wang X, Fu P. Growth and development of infants with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Yonsei Med J.* 2009;50(5):667-71.

163. Ivarsson SA, Jönsson K, Jonsson B. Birth characteristics and growth pattern in children with congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2003;16(9):1233-8.
164. Ivarsson S a, Lernmark B, Svanberg L. Ten-year clinical, developmental, and intellectual follow-up of children with congenital cytomegalovirus infection without neurologic symptoms at one year of age. *Pediatrics.* 1997;99(6):800-803.

11. ANEXOS

11 ANEXOS

11.1 Anexo I. Consentimiento informado

11.2 Anexo II. Artículos publicados

11.3 Anexo III: Investigadores del registro estatal REDICCMV

11.1 Anexo I. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN INVESTIGACION CLÍNICA
HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Titulo de la Investigación

REGISTRO ESTATAL DE INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS CONGÉNITO (REDICCMV)

Coordinador REDICCMV: Dr. Daniel Blázquez Gamero

Investigador Principal del centro:

INVITACIÓN: Invitamos a su hijo(a) a participar en esta investigación ya que ha sido diagnosticado de una infección congénita por citomegalovirus. A través de este consentimiento informado, cuando decimos “usted” nos referimos a “usted o su hijo/a”.

Esta investigación médica consiste en la recopilación y la inclusión en una base de datos de la información de cada paciente con esta infección. Esta información puede ayudarnos a mejorar el conocimiento que tenemos sobre esta infección y a mejorar el tratamiento en los casos futuros.

PROPÓSITO:

El propósito de esta investigación conocer las características de los niños infectados por CMV en España, las secuelas que presentan y el resultado de los tratamientos realizados.

PROCEDIMIENTOS:

El estudio solo requiere recoger la información de los pacientes y no se realizarán pruebas o tratamientos adicionales a los que se desarrollen habitualmente en cada centro para el diagnóstico y tratamiento de esta infección. Se incluirán en la recogida de datos las visitas más cercanas a los 3, 6, 12, 24, 36 y 48 meses de edad del sujeto.

De acuerdo con la Ley Orgánica 15/99 de Protección de datos de carácter personal los datos que se requieren (por ejemplo: edad, sexo, datos de salud) son los necesarios para cubrir los objetivos del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerá el nombre de su hijo y su identidad no será revelada a persona alguna.

RIESGOS POSIBLES:

La participación en este estudio no presenta riesgo alguno

POSIBLES BENEFICIOS:

Hasta ahora, el estudio no ofrece ningún beneficio para los pacientes que participen en el estudio.

Beneficio a otros:

El beneficio obtenido consistirá en un mejor entendimiento de la infección congénita por CMV en nuestro medio, de las secuelas que puede generar y del resultado de los tratamientos.

ALTERNATIVAS DE PARTICIPACION EN ESTE ESTUDIO: Una alternativa es de no participar en el estudio.

PARTICIPACION VOLUNTARIA EN INVESTIGACIONES CLINICAS:

Usted tiene el derecho de aceptar o rehusar participación en esta investigación. Si usted decide participar y luego cambiar de opinión, usted está libre de discontinuar participación en cualquier momento.

El rehusar participación no afectará sus derechos legales o la calidad de cuidado médico que usted reciba en este centro

LOS REGISTROS DE SU PARTICIPACION EN ESTA INVESTIGACION: Usted tiene el derecho a privacidad. Cualquier información que se recoja para esta investigación acerca de usted se mantendrá confidencial como lo requiere la ley.

USTED TENDRA UNA COPIA DE ESTE CONSENTIMIENTO PARA SUS ARCHIVOS



CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN INVESTIGACION CLÍNICA
REGISTRO ESTATAL DE INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS CONGÉNITO (REDICCMV)

Coordinador REDICCMV: Dr. Daniel Blázquez Gamero

Investigador Principal del centro:

Su firma en la parte inferior certifica lo siguiente:

- Usted ha leído (o le han leído) la información expuesta en la parte superior.
- Usted ha recibido respuestas a todas sus preguntas.
- Usted ha decidido libremente a participar en esta investigación.
- Usted entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales.

Nombre del familiar o responsable legal (IMPRESA)

Firma del familiar o responsable legal :

Fecha

Nombre del médico que obtiene el consentimiento (IMPRESA)

Firma del médico que obtiene el consentimiento:

Fecha

Nombre del Testigo (IMPRESA)

Firma del testigo:

Fecha

11.2 Anexo II. Artículos publicados.

Cytomegalovirus Genotype Distribution Among Congenitally and Postnatally Infected Patients: Association of Particular Glycoprotein (g)B and gN Types With Symptomatic Disease

5 **Patricia Brañas,^{1,2} Daniel Blázquez-Gamero,^{2,3} Alberto Galindo,⁴ Columbiana Prieto,^{1,2} Iciar Olabarrieta,⁵ Irene Cuadrado,⁶ and Lola Folgueira^{1,2}**

¹Department of Clinical Microbiology, ²Instituto de Investigación Biomédica “i+12”, ³Department of Pediatrics, ⁴Fetal Medicine Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital Universitario 12 de Octubre, ⁵Department of Pediatrics, Hospital Universitario Severo Ochoa, Leganés, and ⁶Department of Pediatrics, Hospital Universitario de Getafe, Madrid, Spain

Background. Human cytomegalovirus is a leading cause of congenital infection, and there are limited data on prognosis markers in disease development. We aimed to study 3 virology targets (glycoprotein [g]B, gN, and UL144) to assess their correlation with congenital infection and various organ system involvement.

Methods. Forty-eight congenital cases and 58 postnatally infected children were included (2003–2014). Genotyping for the 3 targets and distribution among the cohorts were investigated, and the relationship between the gB, gN, and UL144 types with clinical manifestations in congenital infection was also studied.

Results. All of the genotypes were similarly represented among cohorts, and the most prevalent were the UL144B, gB1, and gN1 genotypes. The gB2 genotype was associated with abnormal image findings by ultrasound and/or magnetic resonance in congenital infection (odds ratio [OR], 6.2; 95% confidence interval [CI], 1.1–34.3; $P = .036$); the gN1 genotype was associated with an elevated risk of developing neurological disorders (OR, 7.0; 95% CI, 1.1–45.9; $P = .043$). Both gN1 and gB2 were independent factors for symptomatic infection. Statistical analyses showed no association between any UL144 genotype and disease severity.

Conclusions. All of the genotypes can be involved in congenital infection, although the gB2 and gN1 genotypes might be associated with a more serious illness.

Keywords. congenital infection; cytomegalovirus; gB; genotypes; gN; UL144.

Human cytomegalovirus (CMV) is a leading cause of congenital infection worldwide. In industrialized countries, it affects an average 0.6%–0.7% of newborns, and approximately 10%–15% of these present with symptoms at birth [1, 2]. Disease severity in symptomatic children is variable, ranging from mild symptoms to

severe sensorineural hearing loss (SNHL) and long-term neurological sequelae [3–5].

Primary infections during pregnancy could lead to intrauterine transmission of CMV, although a transmission in previously seropositive women due to a reactivation or reinfection is the major route [6–8]. It is not typically possible to recognize CMV seroimmune status or to establish the moment of acquisition for documented primary infection because universal screening during pregnancy does not exist in most countries. In addition, there is no clear disease severity correlation between newborns born from women who are primarily or not primarily infected [4, 5].

Some viral factors have been postulated to be CMV pathogenicity markers [9–12]. Envelope glycoproteins are implicated in the recognition and input to the host cell, playing a potential role in the virulence of the

Received 27 August 2015; accepted 30 September 2015.
Correspondence: Patricia Brañas (patriciabg1984@gmail.com).

Open Forum Infectious Diseases

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com.
DOI: 10.1093/ofid/ofv151

various clinical isolates. Glycoprotein (g)B and gN are involved in the initial attachment of the virion to the cell surface, and the polymorphisms in these genes (UL55 and UL73, respectively) have been widely studied. Previous reports have associated particular gB or gN genotypes with severe congenital CMV (cCMV) infection, but information is scarce and is contradictory between studies [13–20]. There is also emerging interest in the study of other viral regions involving the host immune response. This interest is applied to UL144, a truncated tumor necrosis factor- α -like receptor gene, which contributes to the ability of CMV to escape immune clearance [9]. The association between the UL144 CMV genotype and the outcome in congenital infection has been investigated, but the heterogeneity between studies and the small number of congenital cases included have had inconsistent results [21–25].

We aimed to study the viral UL55, UL73, and UL144 genes to assess their correlation with cCMV infection and the involvement of various organ systems in CMV disease. The circulating strains of viral CMV in our geographic area were also studied, and a group of children with postnatal primary infection was included for this purpose.

MATERIAL AND METHODS

Study Population and Clinical Isolates

A retrospective study was conducted at Hospital Universitario 12 de Octubre, a tertiary care facility in Madrid, Spain, whose virology laboratory is a reference laboratory for the Southern area of Madrid, and which routinely receives samples from other hospitals (Hospital Universitario Severo Ochoa and Hospital Universitario de Getafe). The subjects involved in the study were identified from the virology laboratory database. We reviewed all of the positive CMV results from urine cultures and positive polymerase chain reaction (PCR) detections (amniotic fluid, fetal blood, and dried blood spots) from 2003 to 2014. Patients were included based upon virological results, detailed clinical records, and a specimen available at the moment of the study (kept frozen at -80°C). Approval from our hospital's ethics committee was obtained, and informed consent was given by the source hospitals.

A total of 48 congenital cases were included in the study, consisting of 36 newborns and 12 infected fetuses. Demographical and clinical data from all congenitally infected patients were recorded, including sex, gestational age at birth, presence of abnormal image findings by ultrasound (US) and/or magnetic resonance (MR) compatible with cCMV infection, clinical signs, neurologic abnormalities, SNHL, chorioretinitis, and laboratory findings at birth.

Included in the study were maternal age, human immunodeficiency virus (HIV) infection and other immunodeficiencies, treatment with CMV-specific hyperimmune globulin (HIG) during pregnancy, and primary maternal CMV infection, as

defined by seroconversion and/or positive immunoglobulin (Ig)M and IgG with low CMV-specific IgG avidity.

Congenital CMV infection was confirmed by virus isolation from the patient's urine or saliva within the first 3 weeks of life (conventional cell culture and shell-vial culture [Viracell CMV-MAB, Granada, Spain] in MRC-5 cell lines) and/or by real-time PCR detection in amniotic fluid, fetal blood, or dried blood spots [26]. Viral load quantification in the blood and amniotic fluid was performed using the CMV R-gene test (Argene, Verhailes, France).

A group of 58 postnatally infected children from the same period of time was also included in the study. Laboratory and clinical records were reviewed. Cytomegalovirus infection was diagnosed based on consistent clinical symptoms (fever, mononucleoside syndrome) and the presence of specific CMV IgM in the patient's serum, as well as the isolation of the virus from the patient's urine. Among the 58 patients, 12 were younger than 4 months of age, and congenital infection was discharged in these cases because a previously negative urine CMV culture was available.

Clinical Definitions

Abnormal image findings in cranial US or cranial MR at birth or during pregnancy were defined as the presence of hydrocephalus, ventriculomegaly, periventricular cysts, white matter abnormalities, cerebral or cerebellar hypoplasia, hippocampal dysplasia, neuronal migration abnormalities, calcifications, ischemic lesions, lissencephaly, and microcephaly. All of the children infected with cCMV underwent a funduscopy and cranial US at birth. All of the children with clinical symptoms and/or abnormal cranial US underwent cranial MR.

Neurologic abnormalities were defined as the presence of seizures, hypotonia, paresis, or spasticity.

Abnormal physical findings at birth were defined as the presence of microcephaly (head circumference <2 standard deviations below the mean for age and birth weight [World Health Organization]), hepatosplenomegaly, petechiae, and/or purpura.

Hearing function was assessed by the brainstem auditory evoked response (BAER) test, and SNHL was defined as a unilateral or bilateral hearing threshold of >20 decibels in the test.

The abnormal laboratory findings were defined as a hemoglobin value <9.5 g/dL (<8 g/dL in preterm infants), a neutrophil count <1000 cells/mm³, a platelet count $<100\,000$ cells/mm³, alanine aminotransferase levels of >80 UI/L, or direct bilirubin levels of >2 mg/dL.

Symptomatic congenital CMV disease at birth was defined as the presence of at least 1 of the following: (1) abnormal physical exam, (2) abnormal image findings in US or MR, (3) SNHL, (4) neurologic abnormalities, (5) chorioretinitis, or (6) laboratory abnormalities. The presence of isolated intrauterine growth retardation, small for gestational age at birth, preterm delivery, or lenticulostriate vasculopathy in cranial US were not considered to be symptomatic criteria.

Characterization of Glycoprotein B, Glycoprotein N, and UL144 Genomic Variants

Genomic viral DNA was extracted from 200 µL of the specimens, which were stored at −80°C, using the NucliSENS easy-MAG instrument (Biomérieux Diagnostics, Marcy l’Etoile, France). Three nested PCR targeting the UL55 (gB), UL73 (gN), and UL144 genes were performed according to published protocols [27–29]. The amplicons were sequenced by using Big Dye 3.1 sequencing technology (3130 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Austin, TX). Genotypes for each target were determined by comparing the divergence of each amplicon with the reference sequences previously submitted to GenBank via the neighbor-joining tree-building method.

The sequences obtained were deposited at GenBank under the following accession numbers: KR992723–KR992835 for UL144 sequences; KR992836–KR992947 for gB sequences; and KR992948–KR993060 for gN sequences.

Statistical Analysis

The data were collected and analyzed using SPSS software version 15.0 (SPSS, Chicago, IL). Genotype distribution among congenitally and postnatally infected patients, the relationship between the gB, gN, and UL144 genotype, and the outcome of CMV congenital infections were analyzed using a 2-tailed χ^2 test or Fisher’s exact test for categorical variables and the Mann–Whitney *U* test for continuous variables. Logistic regression analysis was used to assess the associated risk between particular genotypes and the variables of the study. An unadjusted and adjusted (for treatment with HIG during pregnancy) odds ratio (OR) and associated 95% confidence interval (CI) were obtained. A *P* value < .05 was considered statistically significant.

RESULTS

Clinical Data on Congenitally Infected Patients

The clinical records of the 36 congenitally infected newborns are summarized in Table 1. We found a 50% proportion of symptomatic neonates. Sensorineural hearing loss, neuroimaging findings, and neurologic abnormalities were found in 83.3%, 83.3%, and 66.7% of the symptomatic patients, respectively. The most common pathological image findings found were white matter disease (66.7%), intracranial calcifications (38.9%), periventricular cysts (27.8%), ventricular adhesions (16.7%), and hydrocephalus (16.7%). Of symptomatic newborns in the study, 72.2% were treated with antiviral therapy (ganciclovir or valganciclovir).

Regarding the 12 cases of pregnancies that were terminated, 1 was a spontaneous abortion, and the rest were interrupted on the basis of pathologic ultrasound findings (*N* = 10) and/or alterations in the cord blood analytical parameters (thrombopenia and elevated β_2 microglobulin) (*N* = 8). The primary image

Table 1. Clinical and Laboratory Findings at Birth and Pathologic Obstetric Evaluations From Newborns Congenitally Infected With Cytomegalovirus

Variable	Total (N = 36)
Male sex (%)	18 (50.0)
Gestational age (wks) ^a	38.0 (IQR, 37.0–41.0)
Weight (g) ^a	2755.0 (IQR, 2250.0–3295.0)
Length (cm) ^a	48.0 (IQR, 45.0–50.0)
Head circumference (cm) ^a	34.0 (IQR, 31.75–35.0)
Neuroimaging findings (%) ^b	15 (41.7)
Sensorineural hearing loss (%)	15 (41.7)
Chorioretinitis (%)	1 (2.8)
Microcephaly (%)	3 (8.3)
Small for gestational age (%)	5 (13.9)
Cardiomegaly (%)	4 (11.1)
Hyperechogenic bowel lesions (%)	1 (2.8)
Amniotic fluid levels altered (%)	2 (5.6)
Petechiae (%)	6 (16.7)
Hepatomegaly (%)	2 (5.6)
Splenomegaly (%)	2 (5.6)
Neurologic abnormalities (%) ^c	12 (33.3)
Laboratory findings (%) ^d	3 (8.3)

Abbreviations: IQR, interquartile range; MR, magnetic resonance; US, ultrasound.

^a Data expressed as median (IQR).

^b Neuroimaging findings in cranial US or cranial MR were defined as the presence of hydrocephalus, ventriculomegaly, periventricular cysts, white matter abnormalities, cerebral or cerebellar hypoplasia, hippocampal dysplasia, neuronal migration abnormalities, calcifications, ischemic lesions, lissencephaly, and microcephaly.

^c Neurologic abnormalities were defined as the presence of seizures, hypotonia, paresis, or spasticity.

^d Laboratory findings were defined as a hemoglobin value <9.5 g/dL (<8 g/dL in preterm infants), a neutrophil count <1000 cells/mm³, a platelet count <100 000 cells/mm³, alanine aminotransferase levels of >80 U/L, or direct bilirubin levels of >2 mg/dL.

abnormalities found in the fetus were hepatomegaly (66.7%), cardiomegaly (41.7%), ascitis (41.7%), splenomegaly (33.3%), hydrops (33.3%), periventricular cysts (33.3%), central nervous system (CNS) parenchymal lesions (16.7%), and cerebral ischemic damage (16.7%).

Pregnancy Information

Primary CMV infection was confirmed in 45.8% of the pregnant women, whereas it was not possible to determine the moment of acquisition in the remaining 54.2% of the cases. The women had a median age of 32.5 years (interquartile range [IQR], 27.0–35.5), 88.9% were born in Spain, and 11.1% were from South America. Four mothers (8.3%) were infected with HIV, but no transmission to the fetus occurred in those cases. Nine (19.6%) mothers with a positive CMV result in amniotic fluid decided to be treated with HIG to prevent the development of symptomatic congenital CMV infection.

Table 2. Frequencies of Glycoprotein (g)B, gN, and UL144 Genotypes Among Congenitally and Postnatally Infected Patients

	All Isolates (N = 106)	Congenital (N = 48)	Postnatal (N = 58)	P Value
gB genotype (%)				
1	44 (41.6)	17 (35.4)	27 (46.6)	.322
2	28 (26.4)	13 (27.1)	15 (25.9)	1.00
3	26 (24.5)	12 (25.0)	14 (24.1)	1.00
4	7 (6.6)	6 (12.5)	1 (1.7)	.045
5	1 (0.9)	0	1 (1.7)	1.00
gN genotype (%)				
1	23 (21.7)	12 (25.0)	11 (19.0)	.486
2	16 (15.1)	9 (18.75)	7 (12.1)	.418
3a	15 (14.1)	6 (12.5)	9 (15.5)	.782
3b	13 (12.3)	5 (10.4)	8 (13.8)	.768
4a	15 (14.1)	9 (18.75)	6 (10.3)	.268
4b	9 (8.5)	1 (2.1)	8 (13.8)	.038
4c	15 (14.1)	6 (12.5)	9 (15.5)	.782
UL144 genotype (%)				
A	23 (21.7)	9 (18.75)	14 (24.1)	.637
B	39 (36.8)	16 (33.3)	23 (39.7)	.548
C	24 (22.6)	14 (29.2)	10 (17.2)	.167
A/C	18 (17.0)	9 (18.75)	9 (15.5)	.796
A/B	2 (1.9)	0	2 (3.5)	.500

Cytomegalovirus Genotyping

Genotyping was performed on 106 viral isolates (48 from congenital cases and 58 from postnatal cases) that were obtained from urine (N = 86), fetal blood (N = 9), amniotic fluid (N = 6), dried blood spots (N = 4), and saliva (N = 1). The median viral load in the fetal blood, amniotic fluid, and dried blood spots were as follows: 145 781 IU/mL (IQR, 86 000–1 984 550), 23 617 933.5 IU/mL (IQR, 16 671 083.5–27 235 908), and 8619 IU/mL (IQR, 1864–13 780), respectively.

All of the UL144 (A, B, C, A/C, A/B), gB (1–5), and gN (1, 2, 3a, 3b, 4a, 4b, 4c) genotypes were detected within the study population. The UL144 genotype B (36.8%), gB genotype 1 (41.6%), and gN genotype 1 (21.7%) were the most prevalent genomic variants. In contrast, the recombinant UL144 genotype A/B, gB genotype 5, and gN genotype 4b were found at the lowest frequencies (1.9%, 0.9%, and 8.5%, respectively). The genotype distribution for the 3 targets was similar between the congenital and postnatal groups, although gB genotype 4 was more frequent among the congenitally infected patients (12.5% vs 1.7%; $P = .045$), and gN genotype 4b was more frequently reported among the postnatally infected children (13.8% vs 2.1%; $P = .038$). However, gB genotype 5 and UL144 genotype A/B were not detected in congenital cases (Table 2).

Distribution of Viral Isolates Over Time (2003–2014)

We studied genotype distribution patterns in periods of 2 years, observing a similar distribution of genotypes between cohorts.

We did not find any combination of particular gB/gN, gB/UL144, or gN/UL144 genotypes among clinical isolates. We also reported the displacement of circulating viral strains over years. An increasing trend in the number of congenital cases occurred until 2011 (Figure 1).

Genotype Association With Congenital Infection

We aimed to study the involvement of particular CMV genotypes in the development of symptomatic disease at birth, as well as its association with image findings, SNHL, neurological disorders, and analytical parameters. The statistical analysis showed no association between any UL144 genotype and specific clinical manifestations. However, regarding the UL55 gene, the gB2 genotype was associated with the presence of abnormal findings in image studies at birth ($P = .046$). After including in the analysis the fetuses from interrupted pregnancies with CNS abnormalities on fetal US, significant differences remained ($P = .030$). In the logistic regression analysis, the OR (adjusted by HIG treatment during pregnancy) for gB2 and abnormal image findings were 6.2 (95% CI, 1.1–34.3; $P = .036$) (Table 3).

On the other hand, gB4 was linked with a better prognosis, and no children or fetuses with this genotype presented abnormal image findings ($P = .015$). It was not possible to calculate the OR and 95% CI for this association (Table 3). Patients with the gB4 genotype presented higher platelet counts at birth (324 200 cells/L vs 187 600 cells/L; $P = .067$).

The study of the UL73 gene showed an association between the gN1 genotype and neurologic findings at birth ($P = .029$); in the logistic regression analysis, adjusted OR was 7.0 (95% CI, 1.1–45.9; $P = .043$) (Table 3). The gN1 genotype was also associated with a lower platelet count at birth compared with other gN variants (120 400 cells/L vs 238 550 cells/L; $P = .037$). The gN1 genotype was not associated with abnormal image findings ($P = .081$) (Table 3).

Finally, we did not find any association between a particular gB or gN genotype and SNHL.

DISCUSSION

Although cCMV infection is a major cause of long-term sequelae in children worldwide, in most countries there is no current strategy for general screening during pregnancy or in newborns. Moreover, most cases are asymptomatic at birth; however, even in these cases, the rate of long-term sequelae is important [30, 31]. In this scenario, it is of paramount importance to establish sensitive and accurate prognostic markers to guide the management of congenitally infected patients.

As with other viral infections, organ system involvement caused by CMV is a balance between the pathogenicity of the strain and the host's immune ability to neutralize the infection [32]. The viral load in blood or urine has been reported to be a prognostic marker of CMV infection. The levels of viral load in

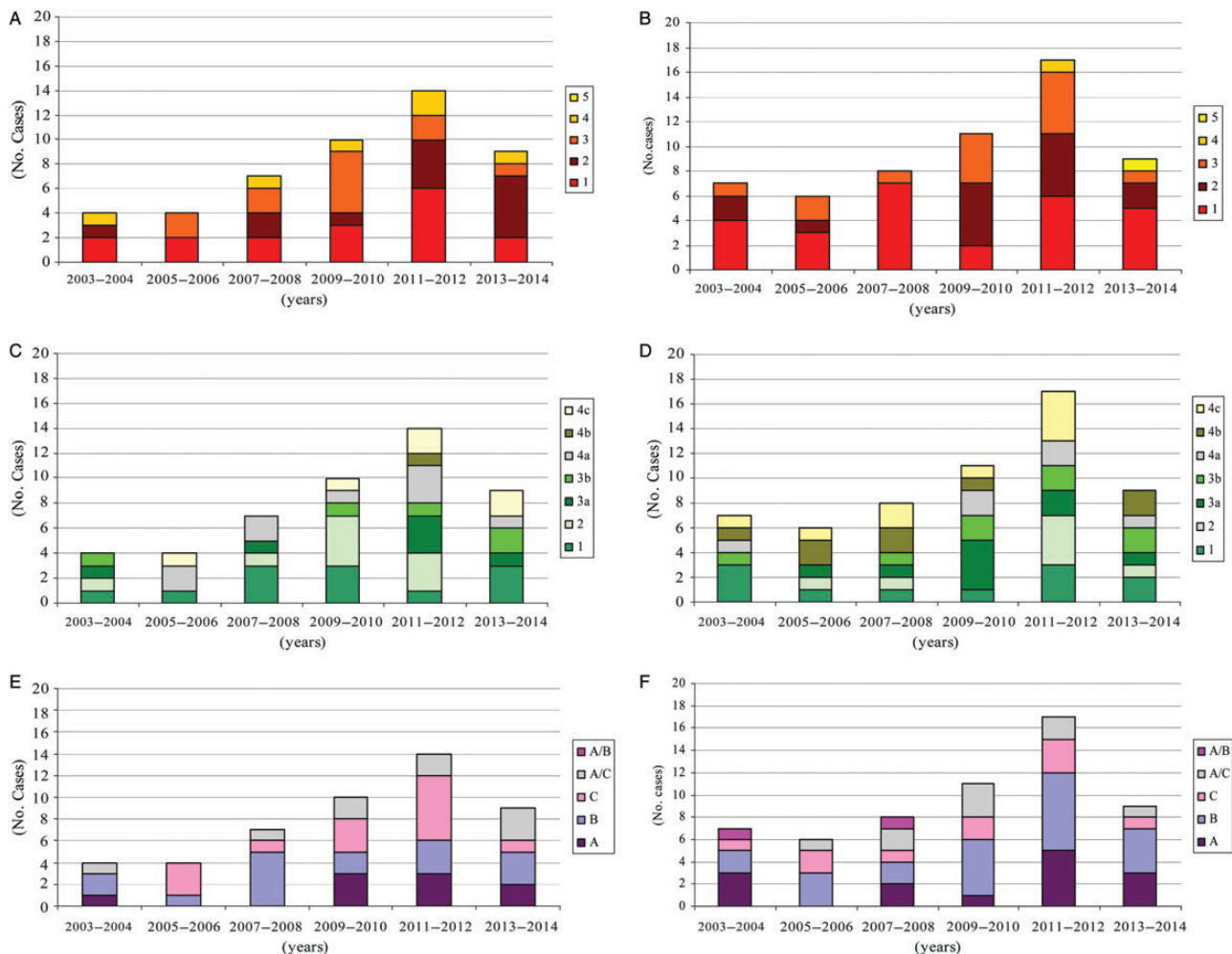


Figure 1. Distribution of viral glycoprotein (gB and gN) and UL144 genotypes over a 12-year study period (2003–2014). (A) The gB genotype distribution in congenital cases. (B) The gB genotype distribution in postnatal group. (C) The gN genotype distribution in congenital cases. (D) The gN genotype distribution in postnatal group. (E) UL144 genotype distribution in congenital cases. (F) UL144 genotype distribution in postnatal group.

Table 3. Association of Viral Genotypes and Outcome in Congenital Infection

Clinical Manifestation	Genotype	OR (95% CI)	P Value	Adjusted OR (95% CI) ^c	Adjusted P Value ^c
Abnormal image findings ^a	gB2	6.3 (1.2–33.4)	.030	6.2 (1.1–34.3)	.036
	gB4	— ^d	.015	— ^d	— ^d
	gN1	4.5 (.8–24.0)	.081	3.9 (.7–22.3)	.123
Neurological disorders ^b	gB2	5.0 (.9–26.5)	.059	4.5 (.8–24.6)	.082
	gB4	0.5 (.4–4.6)	.504	0.4 (.04–4.7)	.510
	gN1	7.9 (1.2–49.8)	.029	7.0 (1.1–45.9)	.043
SNHL ^b	gB2	3.0 (.6–15.3)	.186	2.4 (.4–13.9)	.314
	gB4	— ^e	.062	— ^e	— ^e
	gN1	4.7 (.8–29.0)	.092	3.7 (.5–25.2)	.179

Abbreviations: CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; MR, magnetic resonance; OR, odds ratio; SNHL, sensorineural hearing loss; US, ultrasound.

^a Data from 46 patients (36 congenitally infected newborns and 10 fetuses from pregnancies interrupted by pathological image findings).

^b Data from 36 congenitally infected newborns.

^c Data adjusted for treatment with CMV-specific hyperimmune globulin during pregnancy.

^d It was not possible to calculate OR (95% CI) because none of the patients with the gB4 genotype presented abnormal image findings in US/MR.

^e It was not possible to calculate OR (95% CI) because none of the patients with the gB4 genotype presented SNHL at birth.

urine have been observed to be higher in congenital than in acquired infection [15], and 1 study has recently reported that CMV DNAemia could predict CMV sequelae in asymptomatic congenitally infected newborns [33]. Further studies with larger and homogeneous populations are required to establish a viral load cutoff, because there is evidence that DNAemia and urine excretion could be high and prolonged during CMV infection [34]. In our case, data on the CMV DNA viral load in urine were not available because we used viral cultures and did not quantify samples. For amniotic fluids, fetal blood, and dried blood spots, the viral load values obtained varied among specimens, ranging from 10^3 logarithm values in fetal blood to 10^7 logarithm values in amniotic fluid. The number of determinations was low, and we could not estimate the association with CMV disease.

The linkage between specific envelope glycoproteins and CMV disease has been previously investigated, and data on genotype distribution among congenitally infected patients are variable between studies [13, 15, 17–19]. As we report, the gB1 type has been found to be the most prevalent in congenital infection [14, 16, 17]. We also identified this genotype as the predominant variant among postnatally infected children, which indicates it is the primary genotype circulating in our geographic area. We found that genotype distribution among cohorts was similar, and that all gB genotypes can be involved in congenital infection, as other authors have also reported [13–15, 17]. Genotype 5 is a much less common circulating genotype, and we only determined 1 patient to be postnatally infected by this variant, so we cannot conclude that there is an association of this genotype with congenital infection. Yan et al [16] reported greater frequencies of the gB3 genotype in congenital than in acquired infection, and they found this variant to be associated with SNHL among congenital cases. Gandhoke et al [20] reported that the gB2 genotype was associated with CNS disease and SNHL among CMV-infected babies, although the study design and the criteria to define the study population (congenital and noncongenital cases) were not clearly established, thus the results should be carefully considered.

Our research revealed that the gB2 genotype was associated with abnormal image findings in the fetus and newborns with congenital infection, whereas gB4 might be associated with a lower risk of abnormal image findings. However, the number of infants with the gB4 genotype is small and the study is not sufficiently powered to assess this association. Abnormal cranial image findings in fetuses and newborns with cCMV infection are well known prognostic factors of long-term sequelae, including SNHL [35–37], and, to our knowledge, this is the first report that finds a relationship with a particular gB genotype.

Regarding gN types, we found a similar distribution of genotypes among cohorts, with gN1 being the most prevalent in congenital infection and gN3a the most prevalent in the postnatal group. Other authors found the gN4c or gN3a genotypes the

most representative in congenital infection [17, 19]. Although the frequencies are similar to ours, the differences could reflect geographical distribution and the time of the studies. We found all genotypes both in congenital and acquired infection, although genotype 4b showed a trend toward a higher prevalence among noncongenital patients ($P = .038$), suggesting a reduced ability of this type to be transmitted in utero.

Some authors have documented an association between particular gN genotypes and disease severity in congenital infection. Pignatelli et al [19] found the gN1 and gN3a genotypes more frequently represented in asymptomatic patients with a favorable long-term outcome, and the gN4 genotypes more frequently represented in patients with symptoms at birth and more sequelae. Paradowska et al [18] also reported the detection of the gN2 or the gN4 genotypes in the children who were most seriously affected. Our results do not confirm prior observations, and, in contrast, we found the gN1 genotype more frequently in newborns with neurological disorders and lower platelet counts at birth.

We also investigated the UL144 gene due to its role in the virus's ability to escape the immune response. Previous studies have reported an association between UL144 genotypes and congenital infection [21, 23, 24], and other authors have reported no linkage between the congenital picture and disease severity [16, 22, 25, 29]. We did not find any association between a particular UL144 genotype and symptomatic disease. The distribution of UL144 genotypes in our population is consistent with previously reported data: the B genotype is the primary genotype represented both in congenital and acquired infection. However, we found higher frequencies of A, C, and A/C genotypes than other studies reported [16, 22, 23].

Genomic variation among CMV strains and intrahost viral diversity have recently been characterized through next-generation sequencing [38, 39], and the extensive variability found could be comparable to many RNA viruses. Mixed populations of the virus have been documented in congenitally infected fetuses and newborns as well as in pregnant women [14, 17, 39–41]. Our study characterizes the primary circulating genotypes in the affected patients, and these genotypes are hypothetically the most important viral populations that could ultimately lead to disease severity.

CONCLUSIONS

Although the data presented here are compelling, this study has some limitations. First, this is a retrospective research, and due to the patient's inclusion criteria and the lack of a current strategy to identify congenital cases, we obtained a high rate of symptomatic infections among live-born infants (50%), which does not represent the prevalence in Madrid (Spain). We have probably detected the most serious infections. Second, the information about the moment of the infection during pregnancy was

not available in all cases, so we cannot know whether women were primarily or not-primarily infected. In spite of this, we present a 12-year study that provides a good depiction of the main circulating strains of CMV among congenitally and postnatally infected children in Madrid, Spain. We included patients based on very strict criteria and clinical data collected is complete and thoroughly detailed, which allows us to establish associations between genotypes and outcome in congenital infection. Of the 3 viral targets that we have investigated, gB seems to be the most appropriate because we have found some evidence about certain genotypes and the abnormal image findings present in the infected patients. Further studies are warranted to analyze the evolution of patients in time, both symptomatic and asymptomatic, and the implication of genotypes during the follow up.

Acknowledgments

We thank Luis Manuel Prieto from Hospital Universitario de Getafe, María Isabel González-Tomé and Pablo Rojo on behalf of the study Group of congenital cytomegalovirus from Hospital Universitario 12 de Octubre for clinical assistance, and David Lora from the Instituto de Investigación Biomédica “i+12” for statistical analysis support.

Financial support. This work was supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (FIS13/02147).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest.

References

- Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* **2007**; 17:253–76.
- Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* **2007**; 17:355–63.
- Dreher AM, Arora N, Fowler KB, et al. Spectrum of disease and outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* **2014**; 164:855–9.
- Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, et al. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* **2013**; 26:86–102.
- Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital cytomegalovirus infection: clinical outcome. *Clin Infect Dis* **2013**; 57:S178–81.
- Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, et al. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* **2001**; 344:1366–71.
- Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Moura Brito RM, et al. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin Infect Dis* **2009**; 49:522–8.
- de Vries JJ, van Zwet EW, Dekker FW, et al. The apparent paradox of maternal seropositivity as a risk factor for congenital cytomegalovirus infection: a population-based prediction model. *Rev Med Virol* **2013**; 23:241–9.
- Benedict CA, Butrovich KD, Lurain NS, et al. Cutting edge: a novel viral TNF receptor superfamily member in virulent strains of human cytomegalovirus. *J Immunol* **1999**; 162:6967–70.
- Miller WE, Zagorski WA, Brennenman A, et al. US28 is a potent activator of phospholipase C during HCMV infection of clinically relevant target cells. *PLoS One* **2012**; 7:e50524.
- Freed DC, Tang Q, Tang A, et al. Pentameric complex of viral glycoprotein H is the primary target for potent neutralization by a human cytomegalovirus vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**; 110:E4997–5005.
- Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, Landini MP. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev Med Virol* **2004**; 14:383–410.
- Picone O, Costa JM, Lereuz-Ville M, et al. Cytomegalovirus (CMV) DNA load in the amniotic fluid of infected fetus. *Prenat Diagn* **2004**; 24:1001–6.
- Pati SK, Pinninti S, Novak Z, et al. Genotypic diversity and mixed infection in newborn disease and hearing loss in congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* **2013**; 32:1050–4.
- Nijman J, Mandemaker FS, Verboon-Macielek MA, et al. Genotype distribution, viral load and clinical characteristics of infants with postnatal or congenital cytomegalovirus infection. *PLoS One* **2014**; 9:e108018.
- Yan H, Koyano S, Inami Y, et al. Genetic variations in the gB, UL144 and UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected Japanese children. *Arch Virol* **2008**; 153:667–74.
- Ross SA, Novak Z, Pati S, et al. Mixed infection and strain diversity in congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* **2011**; 204:1003–7.
- Paradowska E, Jabłńska A, Studzińska M, et al. Distribution of cytomegalovirus gN variants and associated clinical sequelae in infants. *J Clin Virol* **2013**; 58:271–5.
- Pignatelli S, Lazzarotto T, Gatto MR, et al. Cytomegalovirus gN genotypes distribution among congenitally infected newborns and their relationship with symptoms at birth and sequelae. *Clin Infect Dis* **2010**; 51:33–41.
- Gandhoke I, Hussain SA, Pasha ST, et al. Glycoprotein B genotyping in congenital/perinatal cytomegalovirus infection in symptomatic infants. *Indian Pediatr* **2013**; 50:663–7.
- Arav-Boger R, Willoughby RE, Pass RF, et al. Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis- α and β -chemokine receptors in congenital CMV disease. *J Infect Dis* **2002**; 186:1057–64.
- Picone O, Costa JM, Chaix ML, et al. Human cytomegalovirus UL144 gene polymorphisms in congenital infections. *J Clin Microbiol* **2005**; 43:25–9.
- Waters A, Hassan J, deGascun C, et al. Human cytomegalovirus UL144 is associated with viremia and infant development sequelae in congenital infection. *J Clin Microbiol* **2010**; 48:3956–62.
- Arav-Boger R, Battaglia CA, Lazzarotto T, et al. Cytomegalovirus (CMV)-encoded UL144 (truncated tumor necrosis factor receptor) and outcome of congenital CMV infection. *J Infect Dis* **2006**; 194:464–73.
- Bale JF Jr, Petheram SJ, Robertson M, et al. Human cytomegalovirus a sequence and UL144 variability in strains from infected children. *J Med Virol* **2001**; 65:90–6.
- Watzinger F, Suda M, Preuner S, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol* **2004**; 42:5189–98.
- Stranska R, Schuurman R, Toet M, et al. Application of UL144 molecular typing to determine epidemiology of cytomegalovirus infections in preterm infants. *J Clin Microbiol* **2006**; 44:1108–10.
- Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, et al. Latency-associated human cytomegalovirus glycoprotein N genotypes in monocytes from healthy blood donors. *Transfusion* **2006**; 46:1754–62.
- Lurain NS, Kapell KS, Huang DD, et al. Human cytomegalovirus UL144 open reading frame: sequence hypervariability in low-passage clinical isolates. *J Virol* **1999**; 73:10040–50.
- Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J Clin Virol* **2005**; 35:226–31.
- Williamson WD, Demmler GJ, Percy AK, Catlin FI. Progressive hearing loss in infants with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* **1992**; 90:862–6.
- Hanley PJ, Bollard CM. Controlling cytomegalovirus: helping the immune system take the lead. *Viruses* **2014**; 6:2242–58.
- Forner G, Abate D, Mengoli C, et al. High cytomegalovirus (CMV) DNAemia predicts CMV sequelae in asymptomatic congenitally infected newborns born to women with primary infection during pregnancy. *J Infect Dis* **2015**; 212:67–71.

- 520 34. Cannon MJ, Hyde TB, Schmid DS. Review of cytomegalovirus shedding
in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection.
Rev Med Virol **2011**; 21:240–55.
35. Guerra B, Simonazzi G, Puccetti C, et al. Ultrasound prediction of
symptomatic congenital cytomegalovirus infection. Am J Obstet Gynecol
525 **2008**; 198:380.e1–7.
36. Ancora G, Lanari M, Lazzarotto T, et al. Cranial ultrasound scanning
and prediction of outcome in newborns with congenital cytomegalovirus
infection. J Pediatr **2007**; 150:157–61.
37. Capretti MG, Lanari M, Tani G, et al. Role of cerebral ultrasound and
magnetic resonance imaging in newborns with congenital cytomegalovirus
530 infection. Brain Dev **2014**; 36:203–11.
38. Sijmoms S, Van Ranst M, Maes P. Genomic and functional characteristics
of human cytomegalovirus revealed by next-generation sequencing. Viruses
2014; 6:1049–72.
39. Renzette N, Bhattacharjee B, Jensen JD, et al. Extensive genome-wide
535 variability of human cytomegalovirus in congenitally infected infants.
PLoS Pathog **2011**; 7:e1001344.
40. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, de Deus Wagatsuma VM, et al.
Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Brazilian mothers
and their congenitally infected infants. J Med Virol **2007**; 79: 1164–8. 540
41. Rycel M, Wujcicka W, Zawilinska B, et al. Mixed infections with distinct
cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Polish pregnant women,
fetuses and newborns. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **2015**; 34:585–91.

Q9



Short Communication

Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection beyond the neonatal period

Teresa del Rosal^{a,*}, Fernando Baquero-Artigao^a, Daniel Blázquez^b, Antoni Noguera-Julian^c, David Moreno-Pérez^d, Alejandro Reyes^e, Javier Vilas^f

^a Department of Pediatrics, Hospital La Paz, Paseo de la Castellana 268, 28046 Madrid, Spain

^b Department of Pediatrics, Hospital 12 de Octubre, Avenida de Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain

^c Infectious Diseases Unit, Department of Pediatrics, Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, Pg. de Sant Joan de Déu 2, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

^d Infectious Diseases and Immunodeficiency Unit, Department of Pediatrics, Hospital Materno-Infantil Carlos Haya, Universidad de Málaga, Avda. Arroyo de Los Ángeles s/n, 29011 Málaga, Spain

^e Department of Pediatrics, Hospital Príncipe de Asturias, Carretera de Alcalá Meco s/n, 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

^f Department of Pediatrics, Complejo Hospitalario de Pontevedra, Loureiro Crespo 2, 36001 Pontevedra, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 March 2012

Received in revised form 31 May 2012

Accepted 7 June 2012

Keywords:

Congenital cytomegalovirus infection

Valganciclovir

Hearing loss

Infants

ABSTRACT

Background: Congenital cytomegalovirus (CMV) is an important cause of sensorineural hearing loss. Ganciclovir treatment in the neonatal period may prevent hearing deterioration in infants with central nervous system (CNS) involvement. However, there are hardly any data regarding antiviral treatment begun beyond the neonatal period.

Objectives: To describe the hearing outcome of infants with congenital CMV infection and CNS involvement treated beyond the neonatal period. To assess the tolerability and toxicity of prolonged valganciclovir treatment in these patients.

Study design: Retrospective case series of infants with congenital CMV infection and CNS involvement who started antiviral treatment beyond the neonatal period in Spain between 2008 and 2010. Hearing was tested by brainstem-evoked response at the time of diagnosis, 6 and 12 months after the beginning of treatment.

Results: Thirteen cases were included. All received oral valganciclovir, and 4 also intravenous ganciclovir. Median valganciclovir treatment duration was 6 months and it was well tolerated. Six patients developed neutropenia, none requiring granulocyte colony-stimulating factor. Eleven children (85%) had hearing defects at baseline, compared to 50% at 12 months. By ears, 18 ears showed hearing loss at baseline (7 mild, 3 moderate, 8 severe). At 12 months, 9 remained stable, 7 had improved and none had worsened. In 8 normal ears at baseline, no deterioration was found at 12 months.

Conclusions: Valganciclovir treatment is well tolerated. It may improve or preserve the auditory function of congenitally cytomegalovirus-infected patients treated beyond the neonatal period for at least one year after the beginning of antiviral treatment.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

Cytomegalovirus (CMV) is the most common congenital infection and the leading nongenetic cause of sensorineural hearing loss in developed countries.¹ Long-term sequelae occur in 40–58% of infected children with CMV-specific symptoms at birth and in

13.5% of asymptomatic infants.² Treatment with intravenous ganciclovir for 6 weeks, starting in the neonatal period, may prevent hearing deterioration in symptomatic infants with central nervous system (CNS) involvement.³ Newborn CMV screening is not performed on a population basis, so infants with asymptomatic and some with oligosymptomatic infections are not usually diagnosed at birth.⁴ However, there are hardly any data regarding antiviral treatment begun beyond the neonatal period, and its efficacy to prevent hearing deterioration is unknown.⁵

2. Objectives and study design

A multicenter, retrospective case-series of infants with congenital CMV infection with CNS involvement who started antiviral

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; CNS, central nervous system; DBS, dried blood spots; PCR, polymerase chain reaction; BAER, brainstem auditory evoked response; GCV, ganciclovir; VGC, valganciclovir; dB, decibels; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

* Corresponding author. Tel.: +34 917277443; fax: +34 917277479.

E-mail address: teredelrosal@yahoo.es (T. del Rosal).



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Diagnóstico precoz de la infección congénita por citomegalovirus: oportunidades perdidas

Raquel Nuñez-Ramos^a, Jesús Becerril^{a,*}, Daniel Blázquez^a, Pablo Rojo^a, Joaquín de Vergas^b y Dolores Folgueira^c, en representación del Grupo de Estudio del CMVc del Hospital 12 de Octubre[◇]

^a Departamento de Pediatría, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

^b Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

^c Servicio de Microbiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 8 de mayo de 2012

Aceptado el 26 de junio de 2012

On-line el 15 de agosto de 2012

Palabras clave:

Citomegalovirus
Infección congénita
Sordera
Cribado neonatal

Keywords:

Cytomegalovirus
Congenital infection
Hearing loss
Neonatal screening

R E S U M E N

Introducción: La infección por citomegalovirus (CMV) es la infección congénita más frecuente en Europa. El 10% de los niños infectados presentan síntomas al nacimiento, y hasta el 30–40% tienen algún grado de hipoacusia.

Métodos: Se ha realizado un estudio descriptivo retrospectivo incluyendo todos los pacientes diagnosticados de infección congénita por CMV fuera del período neonatal a lo largo de 4 años a partir de las muestras de sangre del talón en papel de filtro del cribado metabólico neonatal.

Resultados: Presentamos 5 pacientes diagnosticados de infección congénita por CMV fuera del período neonatal. Los principales motivos de consulta fueron la hipoacusia y/o el retraso psicomotor en los primeros meses de vida.

Conclusión: La infección por CMV puede ser poco sintomática al nacimiento y presentarse como un déficit auditivo y/o retraso psicomotor en la infancia. Es preciso un alto grado de sospecha para establecer un diagnóstico temprano que permita ofrecer tratamiento específico y mejorar el pronóstico a largo plazo.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Early diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: lost opportunities

A B S T R A C T

Introduction: Cytomegalovirus (CMV) infection is the most common congenital infection in Europe. Symptoms are present at birth in 10% of infected children, and up to 30–40% have some degree of hearing loss after the newborn period.

Methods: A retrospective study was performed over a period of 4 years and included all patients with congenital CMV infection diagnosed after the neonatal period using the dried blood spots from neonatal metabolic screening.

Results: We present 5 patients diagnosed with congenital CMV infection outside the neonatal period. The main reasons for consultation were hearing loss and/or neurological impairment in the first few months of life.

Discussion: Congenital CMV infection may be mildly symptomatic at birth, and present as hearing loss and/or neurological impairment in infancy. Therefore, a high degree of suspicion is necessary in order to make an accurate diagnosis and start specific treatment to improve the outcome.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El citomegalovirus (CMV) es la infección congénita más frecuente en nuestro medio, con una prevalencia que, en función de los distintos países y estudios, varía entre el 0,14 y el 2%^{1,2}. El 10% de los niños infectados presentan síntomas al nacimiento, y hasta el 30–40% de estos pacientes desarrollan algún grado de hipoacusia³. La ausencia o el retraso en el diagnóstico pueden limitar las

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jesus.becerril@yahoo.es (J. Becerril).

◇ El Grupo de Estudio del CMVc del Hospital 12 de Octubre se detalla en el anexo 1.

Cribado de citomegalovirus en prematuros menores de 1.500 g. Comité Científico del Registro Estatal de Infección Congénita por Citomegalovirus



Cytomegalovirus screening in less than 1500 g premature newborns. National Congenital Cytomegalovirus Disease Registry Scientific committee

Sr. Editor:

En octubre de 2014 se ha publicado en ANALES DE PEDIATRÍA una propuesta del Comité de Estándares y el Grupo Castriño de la Sociedad Española de Neonatología sobre el cribado de infección por citomegalovirus (CMV) en prematuros <1.500 g¹. Sobre esta propuesta los investigadores que formamos parte del Comité Científico del Registro Estatal de

Infección Congénita por Citomegalovirus (REDICCMV) queremos realizar algunas consideraciones.

La infección congénita por CMV (CMVc) es asintomática al nacimiento en el 90% de los casos, pero el 50% de los recién nacidos sintomáticos y hasta un 10-15% de los asintomáticos van a presentar secuelas a largo plazo. Aproximadamente un tercio de los recién nacidos con CMVc son prematuros y/o presentan bajo peso para la edad gestacional². La infección posnatal por CMV en prematuros se presenta en un 6-22% de los <1.500 g y puede ocasionar manifestaciones clínicas graves. Por lo tanto, los prematuros <1.500 g son un grupo de alto riesgo en el que se debe recomendar el cribado sistemático de la infección perinatal por CMV.

En la propuesta citada se recomienda realizar cribado universal mediante PCR en orina a los prematuros <1.500 g entre las 4 y 6 semanas de vida. Esta estrategia permitiría detectar a los pacientes con infección congénita y posnatal por CMV. El problema surge al intentar diferenciar el origen congénito o posnatal de la infección en pacientes asintomáticos. El algoritmo sugiere la realización de una PCR en

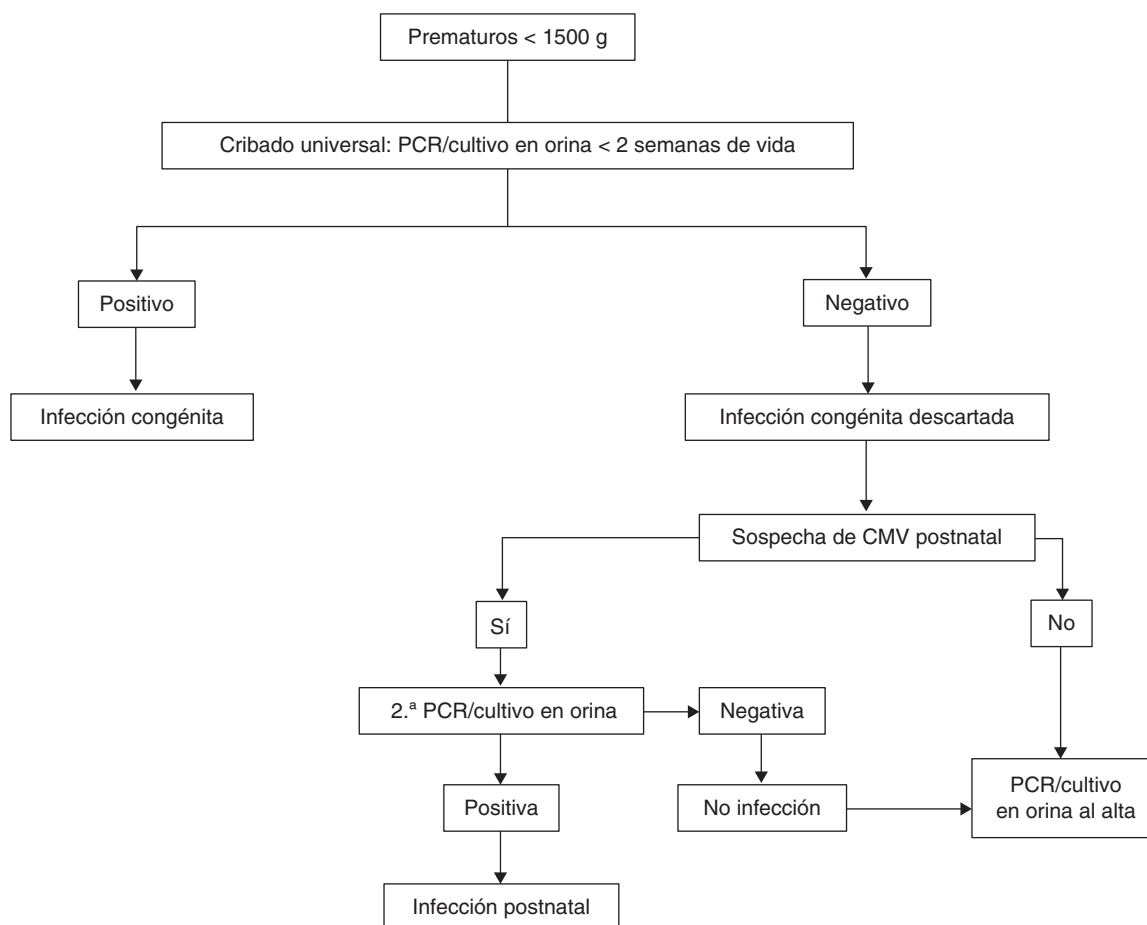


Figura 1 Algoritmo de infección por CMV en prematuros menores de 1.500 g. REDICCMV.

muestra de sangre seca de las pruebas metabólicas recogida en las 2 primeras semanas de vida. Una PCR positiva indicaría infección congénita y una prueba negativa una infección probablemente adquirida. Sin embargo, la PCR en sangre seca presentó baja sensibilidad (35%) para el diagnóstico de CMV en el estudio prospectivo más amplio de cribado³. En el único estudio en España, Vives-Oñós et al. documentan una sensibilidad del 50%⁴. Esta técnica es laboriosa y no está estandarizada en muchos laboratorios del país. La escasa sensibilidad de la PCR en sangre seca podría ocasionar un alto porcentaje de falsos negativos en niños con infección congénita, con implicaciones en el tratamiento y seguimiento a largo plazo.

Desde el REDICCMV planteamos una propuesta alternativa para el cribado de la infección por CMV en prematuros < 1.500 g (fig. 1). La principal diferencia sería la realización del cribado al nacimiento, permitiendo detectar todas las infecciones congénitas, sintomáticas y asintomáticas. Si en el seguimiento un paciente con cribado negativo presentara síntomas compatibles con infección posnatal, una segunda muestra de orina confirmaría el diagnóstico. En los prematuros con cribado negativo y sin síntomas de infección posnatal, sería recomendable la realización de una nueva PCR/cultivo en orina antes del alta. Aunque la infección posnatal no parece aumentar el riesgo de hipoacusia neurosensorial, sí se ha relacionado con una mayor incidencia de alteraciones neurocognitivas a largo plazo.

Coincidimos con los autores en la necesidad de estudios prospectivos en esta población, y confiamos establecer en el futuro protocolos multidisciplinares consensuados sobre la infección perinatal por CMV en los niños prematuros.

Bibliografía

1. Botet F, Figueras Aloy J, Álvarez E, de Alba C, Dorronsolo I, Echaniz Urcelay I, et al. Cribado universal de infección por citomegalovirus en prematuros de menos de 1.500 g. *An Pediatr (Barc)*. 2014;81, 256.e1-256.e4.
 2. Baquero-Artigao F, Grupo de estudio de la infección congénita por citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus. *An Pediatr (Barc)*. 2009;71:535-47.
 3. Boppana SB, Ross SA, Novak Z, Shimamura M, Tolan RW, Palmer AL, et al. Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assay to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *J Am Med Assoc*. 2010;303:1375-81.
 4. Vives-Oñós I, Soler-Palacín P, Codina-Grau MG, Martín-Nalda A, López-Galera RM, Marín-Soria JL, et al. ¿Podemos descartar infección congénita por citomegalovirus cuando la reacción en cadena de la polimerasa viral es negativa en la prueba del talón? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32:570-3.
- L. Escosa-García^{a,*}, F. Baquero-Artigao^a, A. Noguera Julian^b, D. Blázquez Gamero^c y miembros del Comité Científico del Registro Estatal de Infección Congénita por Citomegalovirus (REDICCMV)
- ^a Servicio de Pediatría Hospitalaria, Enfermedades Infecciosas y Tropicales, Hospital Infantil Universitario La Paz, Madrid, España
- ^b Unitat d'infectologia pediàtrica, Servei de Pediatría, Hospital Universitari Sant Joan de Déu, Barcelona, España
- ^c Sección de Inmunodeficiencias, Servicio de Pediatría, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España
- * Autor para correspondencia.
Correo electrónico: luisescosa1983@hotmail.com (L. Escosa-García).
- <http://dx.doi.org/10.1016/j.anpedi.2015.02.019>

11.3 Anexo III. Investigadores del Registro Estatal de Infección Congénita por Citomegaloviurs (REDICCMV).

Hospital	Apellido 1	Número de hospital
Beatriz	Agúndez	14
Mar	Albújar	16
Almudena	Alonso	25
Francisco	Álvarez	35
Fernando	Baquero	17
Juana	Barja	20
Jose	Beceiro	23
Daniel	Blázquez	1
Xavier	Bringué	2
Olga	Calavia	16
Jaime	Carrasco	36
Laura	Castells	10
María José	Cilleruelo	24
Elena	Colino	18
Wilfredo	Coroleu	37
Araceli	Corredera	3
Irene	Cuadrado	11
Roser	Díez	19
María Juncal	Echeverria	8
Luis	Escosa	17
Clotilde	Fernández	25
Laura	Ferreras	6
Ana	Filgueira	29
Claudia	Fortuny	27
María Antoinette	Frick	33
Pilar	Galán	9
María Jesús	García	38

Elisa	Garrote	39
Ana María	Grande	40
Susana	Herrero	29
Ana Belén	Jiménez	41
Natalia	Joaqui	10
Isabel	Llana	31
Marta	Llorente	30
Antonio Francisco	Medina	4
Elisenda	Moliner	5
María	Montero	42
Abian	Montesdeoca	18
Oihana	Muga	8
Antoni	Noguera	27
Esmeralda	Núñez	6
Iciar	Olabarrieta	28
Lorena	Pérez	15
Raquel	Pinillos	43
Roser	Porta	7
Flavia	Pronzato	44
María Teresa	Rives	21
Carlos	Rodrigo	37
Pablo	Rojo	1
Jose Manuel	Rumbao	45
Jesús	Saavedra	12
Paula	Sánchez	46
Pere	Soler	33
Itziar	Sota	8
Beatriz	Soto	11
Alfredo	Tagarro	15
Pedro	Terol	34
Javier	Vilas	22
Isabel	Vives	26

Centros participantes en el registro REDICCMV

Hospital	Referencia
Hospital 12 de Octubre	1
Hospital Arnau de Vilanova	2
Hospital Clínico San Carlos	3
Hospital de la Axarquía	4
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau	5
Hospital Málaga	6
Hospital Dexeus Barcelona	7
Hospital Donostia	8
Hospital Fuenlabrada	9
Hospital General de Catalunya	10
Hospital de Getafe	11
Hospital Gregorio Marañón	12
Hospital Infanta Cristina. Badajoz	13
Hospital Infanta Leonor	14
Hospital Infanta Sofía	15
Hospital Joan XIII	16
Hospital La Paz	17
Hospital Las Palmas de Gran Canaria	18
Hospital de Mataró. Consorci Sanitari del Maresme	19
Hospital Moncloa	20
Hospital de Navarra	21
Hospital de Pontevedra	22
Hospital Príncipe de Asturias	23
Hospital Puerta de Hierro	24
Hospital Puerta del Mar	25
Hospital Quirón (Barcelona)	26

Hospital San Joan de Deu	27
Hospital Severo Ochoa	28
Hospital Son Llatzer	29
Hospital del Sureste (Arganda)	30
Hospital de Torreldones	31
Hospital Universitario de Canarias	32
Hospital Vall d'Hebron	33
Hospital Virgen Macarena de Sevilla	34

Tabla de centros participantes en REDICCMV, con pacientes incluidos en el presente estudio

Hospital	Referencia
Hospital San Agustín de Avilés	35
Hospital la Moraleja	36
Hospital German Trías i Pujol	37
Hospital de Cáceres	38
Hospital de Basurto	39
Hospital de Badajoz	40
Fundación Jiménez Díaz	41
Hospital de Melilla	42
Hospital Miguel Servet	43
Hospital General de Castellón	44
Hospital Infanta Sofía de Córdoba	45
Hospital de Barbanza, A Coruña	46

Tabla de centros participantes en REDICCMV, pero sin pacientes incluidos en el presente estudio